Aus dem Institut für
Medizinische Mikrobiologie und Virologie
(Direktor: Prof. Dr. P. Naumann)

EINFLUSS VON MILZLYMPHOZYTEN DES MEERSCHWEINCHENS AUF DIE PHAGOZYTOSE VON KLEBSIELLA PNEUMONIAE DURCH ALVEOLARMAKROPHAGEN UND DIE WIRKUNG VON GENTAMICIN AUF DIESES SYSTEM

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

HORST SCHROTEN

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Institut für

Medizinische Mikrobiologie und Virologie

(Direktor: Prof.Dr.P. Naumann)

Einfluß von Milzlymphozyten des Meerschweinchens auf die Phagozytose von KLEBSIELLA PNEUMONIAE durch Alveolarmakrophagen und die Wirkung von Gentamicin auf dieses System

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Horst Schroten

1984

Für meinen Vater

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.:
Prof.Dr.A.Hopf

Referent
gez.:
Prof.Dr.H.Brunner
Korreferent
gez.:
Prof.Dr.Dr.P.Pfitzer

INHALTSVERZEICHNIS

1.o.	Einleitung und Literaturübersicht	1
2.o	Material und Methoden	8
2.1.	Gewinnung von Alveolarmakrophagen	8
2.2.	Kultivierung von Alveolarmakrophagen	1o
2.3.	Gewinnung und Charakterisierung von Lymphozyten	11
2.3.1.	Unspezifische-Esterase-Aktivität	14
2.3.2.	Saure Phosphatase-Aktivität	14
2.3.3.	Identifikation von B-Lymphozyten	15
2.3.4.	Identifikation von T-Lymphozyten	16
2.3.4.1.	Herstellung von Aminoäthylisothiouronium-hydrobromid-Erythrozyten	16
2.3.4.2.	Rosettenbildung	16
2.4.	Bakterien	17
2.5.	Antigenherstellung und Immunisierung	17
2.5.1.	Gewinnung von Kapselpolysacchariden	17
2.5.2.	Immunisierung	17
2.6.	Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) zum Antikörpernachweis	18
2.6.1.	Verwendete Puffer	18
2.6.2.	Antigenbeschichtung der Mikroelisaplatten	19
2.6.3.	Konjugatherstellung	2o
2.6.4.	Antikörpertiterbestimmung im Serum	2o
2.6.5.	Enzyme-linked-immunosorbent-assay zur Bestimmung der Antikörperproduktion durch Milzlymphozyten	2o
2.7.	Gentamicin	21
2.8.	Phagozytose	22
2.8.1.	Getrennte Vorkultivierung von Makrophagen und Lymphozyten	22
2.8.2.	Gemeinsame Vorkultivierung von Makrophagen und Lymphozyten	23
2.8.3.	Gemeinsame Vorkultivierung von Makrophagen, Lymphozyten und Gentamicin	23
2.9.	Statistische Berechnungen	24

3.o. Ergebnisse 25

3.1. Antikörpernachweis (ELISA) 25
3.1.1. Antikörpertiter im Serum 25
3.1.2. Antikörperproduktion von Lymphozyten 25
3.2. Charakterisierung der Zellen 25
3.2.1. Alveolarmakrophagen 26
3.2.2. Milzlymphozyten 27
3.2.3. Differenzierung nach T- und B-Lymphozyten 3o
3.3. Phagozytoseexperimente 31
3.3.1. Getrennte Vorkultivierung von Makrophagen und Lymphozyten 31
3.3.2. Gemeinsame Vorkultivierung von Makrophagen und Lymphozyten 33
3.3.3. Gemeinsame Vorkultivierung von Makrophagen, Lymphozyten und Antigen 36
3.3.4. Gemeinsame Vorkultivierung von Makrophagen, Lymphozyten und Gentamicin 39

4.o. Diskussion 42

5.o. Zusammenfassung 47

6.o. Literaturverzeichnis 48

Verwendete Abkürzungen:

LPS	: Lipopolysaccharid
RES	: Retikulo-Endotheliales System
BSA	: Bovines Serumalbumin
Ig-T	: Immunglobulinartiger (7 S Ig M) T-zell Rezeptor
MGG	: May-Grünwald-Giemsa
Ag	: Antigen
Ak	: Antikörper
PHA	: Phytohämagglutinin
PWM	: Pokeweed-Mitogen
MIF	: Migrations inhibierender Faktor
MIT (PHA)	: Durch das Mitogen PHA induzierte Transformation peripherer Lymphozyten (23)
MHK	: Minimale Hemmkonzentration
MBK	: Minimale bakterizide Konzentration
BSL	: Balancierte Salzlösung
AET	: S-(2-aminoethyl)isothiouronium-hydrobromid
MEM Earle	: Minimal essential medium mit Earles Salzen
i.p.	: intra peritoneal
ELISA	: Enzyme-linked-immunosorbent-assay
FKS	: Fetales Kälberserum
PBS	: Phosphatgepufferte Salzlösung
KLH	: Keyhole Limpet Haemocyanin
IgG	: Immunglobulin G

1.o. EINLEITUNG und LITERATURÜBERSICHT

Schon Metschnikoff, der 1883 erstmals den Begriff Phagozyt prägte, hat den Makrophagen eine entscheidende Bedeutung bei der Beseitigung partikulären körperfremden Materials und bei der Abwehr vieler chronischer Infektionen zugemessen (68,69). Makrophagen, Monozyten und Granulozyten (Mikrophagen) sind die wesentlichen Zelltypen, die am Prozess der Phagozytose beteiligt sind. Die Phagozytose wiederum ist der Hauptträger der unspezifischen Abwehr eines Organismus. Man kann sie in mehrere Schritte aufteilen: Opsonisierung von Partikeln durch Serumfaktoren (nicht unbedingt erforderlich), Anheften an die Phagozytenoberfläche, Aufnahme, intrazelluläre Abtötung bei vermehrungsfähigen Mikroorganismen und "Verdauung" (21,25). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der erste Teil dieses Prozesses, die Aufnahme von Bakterien untersucht werden.

Bis 1969 sind Monozyten und Makrophagen im sogenannten Retikuloendothelialen System (RES) zusammengefaßt worden (6). Aufgrund morphologischer und funktioneller Ähnlichkeiten postulierten dann VAN FURTH et al.das "Mononukleäre-Phagozyten-System" (39). Danach beginnt die mononukleäre Phagozyten Zellinie mit einer bisher nur postulierten Stammzelle im Knochenmark. Hauptsächlich dort findet über Monoblasten und Promonozyten eine Proliferation statt (41,49). Als Knochenmarkendstufe dieser Zellreihe werden Monozyten in die Zirkulation entlassen (Blutmonozyten). Nach 2-3 Tagen wandern sie in die verschiedenen Gewebe und differenzieren sich zu Makrophagen: in den Blutsinusoiden der Leber zu Kupfferschen Sternzellen, im Bindegewebe zu Histiozyten, in der Lunge zu Alveolarmakrophagen (42). Dort beträgt ihre Lebensdauer unter Normalbedingungen Monate,im Gegensatz zu Granulozyten, die nur einige Tage überleben (22,1o6). Kennzeichnend für alle Makrophagen ist ihre Fähigkeit, schnell größere Mengen körperfremden oder auch nekrotischen körpereigenen Materials aufzunehmen und mit Hilfe ihrer Enzymsysteme abzubauen (83).

UNIV. LEIDEN BIBL.

Morphologisch zeichnen sie sich gegenüber anderen Zellen durch eine zum Plasma hin verschobene Kern/Plasma-Relation aus. Experimentell macht man sich ihre Eigenschaft, fest an Glasoberflächen zu haften, zunutze. Die Phagozytoseexperimente in der hier vorgestellten Arbeit werden mit Alveolarmakrophagen durchgeführt.

Es ist durch viele Untersuchungen gesichert, daß Alveolarmakrophagen ihren Ursprung im Knochenmark haben (47,54,lo2). In einer neueren Untersuchung von BLUSSE VAN OUD ALBLAS und VAN FURTH konnte mit Hilfe von ^{3}H-Thymidin-Markierung gezeigt werden, daß die Alveolarmakrophagen nicht aus einer sich noch teilenden Vorgängerzelle im Lungeninterstitium, sondern innerhalb weniger Stunden direkt aus zirkulierenden Monozyten, die in das Lungengewebe einwandern, entstehen. Nur wenige Alveolarmakrophagen teilen sich in der Lunge (lo,l3).

Für Alveolarmakrophagen charakteristisch ist eine besonders hohe Atmungsaktivität und maximale Phagozytose unter aeroben Bedingungen (76). Sie synthetisieren u.a. Lysozym, Interferon, Komplementfaktoren, Prostaglandine und Plasminogenaktivator (l4). Gegenüber Peritonealmakrophagen besitzen Alveolarmakrophagen größere und rundere Kerne und sowohl ein geringer ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum als auch einen kleineren Golgiapparat (43).

Die Sterilität der Lunge wird durch die gemeinsame Aktivität dreier Systeme gewährleistet (48):

a) Mucociliares System
b) Phagozytäres System
c) Spezifisches Immunsystem.

Die Alveolarmakrophagen haben dabei wesentlichen Anteil sowohl am phagozytären System, wie auch an der spezifischen Immunabwehr. Zahlreiche Publikationen beschreiben in vivo- und in vitro Experimente zur Reinhaltung der Lunge durch Alveolarmakrophagen, sowohl bei bakteriellen als auch bei nichtbakteriellen Antigenen (l3,48,66,92).

Die Phagozytosetätigkeit von Makrophagen wird um ein Vielfaches gesteigert,und zwar spezifisch (Immunphagozytose) durch opsonisierende Antikörper und Komplementfaktoren (48,83,92,1o7). Dies erklärt sich durch das Vorhandensein von Fc- und C_3b-Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche (8o,4o). Aber auch auf andere Weise sind die Alveolarmakrophagen eng mit der spezifischen Abwehr verbunden. So wird ihnen eine Verhinderung der Immunparalyse zugeschrieben, indem sie übermäßige toleranzinduzierende Antigenmengen durch Phagozytose und Abbau verringern (13,14).

Alveolarmakrophagen sind für in vitro Untersuchungen leicht zugänglich. Die 1961 erstmals von MYRVIK et al.beschriebene Lungenspülung zur Gewinnung von Alveolarmakrophagen beim Kaninchen wurde von MAXWELL für kleinere Laboratoriumstiere verändert (67,73).

Vom Menschen wurden Alveolarmakrophagen 1964 erstmalig in vivo während einer Bronchoskopie durch Lungenspülung gewonnen (97). Ein großer Vorteil der Verwendung von Alveolarmakrophagen liegt darin, daß man diese Zellen durch Lungenspülung mit physiologischer Kochsalzlösung unstimuliert gewinnen kann. Peritonealmakrophagen, die viel häufiger zu in vitro Phagozytoseexperimenten benutzt worden sind, muß man schon bei der Gewinnung als stimuliert betrachten, da meist vorher Substanzen wie Thioglycollat-Brühe, LPS, Glycogen u.a. i.p. injiziert werden, um die Zahl gewinnbarer Phagozyten zu steigern (4,4o).

Neben den Makrophagen spielen die phylogenetisch jüngeren Lymphozyten eine wesentliche Rolle bei der Immunantwort. Rein morphologische Beschreibungen von Lymphozyten genügen heute nicht mehr. Immunologisch ist es vielmehr bedeutsam, B- (vom Bursaäquivalent geprägte) und T- (vom Thymus geprägte) Lymphozyten zu differenzieren. Zur Unterscheidung macht man sich die Eigenschaft der spontanen Rosettenbildung mit Schafserythrozyten bei T-Zellen und die membranständigen Immunglobuline bei B-Zellen zunutze. T- und B-Lymphozyten erkennen spezifisch Antigen und unterliegen einer Differenzierung und Proliferation bis zu einem Effektorendstadium. Sie entwickeln ein spezifisches immunologisches Gedächtnis (memory cells). Im Gegensatz dazu sind Makrophagen ausgereift und haben keine Erinnerungsfunktion (24).

B-Zellen differenzieren sich auf einen Antigenreiz hin zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Bei reinen B-Zell-Antigenen, z.B. Pneumokokkenpolysaccharid Typ III oder LPS, ist dies ohne Kooperation mit anderen Zellen möglich (56,1o9). Bei thymusabhängigen, mikrobiellen Antigenen, besonders fakultativ intrazellulären Bakterien, Viren und Pilzen, bedarf es der Zusammenarbeit mit sogenannten T-Helferzellen (18). Neben der Helferfunktion haben T-Lymphozyten auch noch "Suppressorzellfunktion": sie inhibieren die Antikörperantwort gegen T-Zellantigene (44). Außerdem besitzen sie "zytotoxische Funktion" und sind z.B. verantwortlich für die "Graft-versus-host-Reaktion" (17). Die verzögerte Immunantwort verläuft über T-Lymphozyten. Sowohl stimulierte T-Zellen als auch durch Mitogene (z.B. PWM, Staphylococcus aureus Cowan I) stimulierte B-Zellen können Lymphokine sezernieren, die auf verschiedene Weise Makrophagen beeinflussen (7o,74,1oo). Das bekannteste Lymphokin ist der migration-inhibierende Faktor, MIF (9,26).

Bei immunologischen Vorgängen wirken Makrophagen und Lymphozyten nicht nur über Lymphokine zusammen, sondern auch, indem Makrophagen das Antigen für die T-Lymphozyten, die selbst nicht direkt durch Antigen stimuliert werden können, aufbereiten, und es ihnen anbieten (94). Voraussetzung dafür ist, daß das Antigen an der Makrophagenoberfläche haften bleibt. Weiterhin sezernieren Makrophagen lymphozytenstimulierende Faktoren und haben Teil an der Regulation der T-Zelldifferenzierung (95). Als Inhibitoren der zellulären Immunität wirken sie über die Prostaglandinsekretion (87). Die bisher bekannten Befunde zur Zellkooperation bei der Immunantwort sind in Abb.1,S.5 zusammengestellt.

T - B - Zell-Makrophagenkooperationsmodell

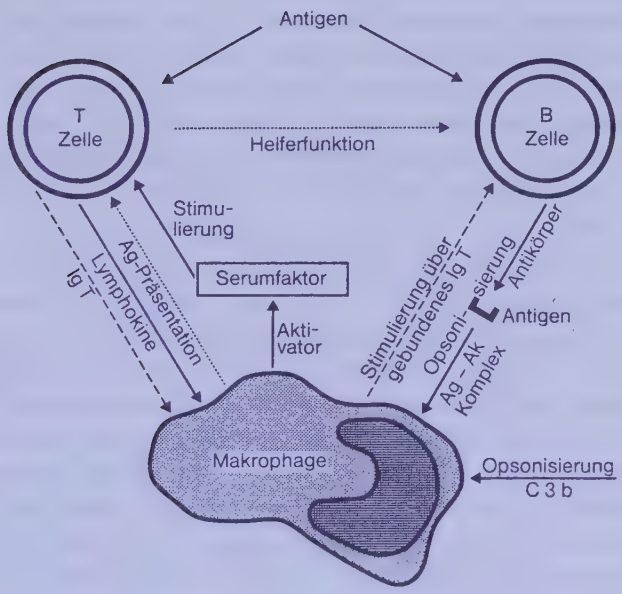

Abb. 1: Zusammengestellt aus Arbeiten von ALLISON, FELDMANN et al., OPITZ et al., PIERCE et al. und UNANUE (4,30,31,75,79,94).

Im Vergleich zu Publikationen, in denen der Einfluß von Antikörpern auf die Phagozytosetätigkeit von Makrophagen gegen gramnegative Bakterien behandelt worden ist, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob und wie Lymphozyten ohne Anwesenheit von Antikörpern auf die Phagozytose wirken (2,92). Bisher ist diese Fragestellung in einigen Untersuchungen bearbeitet worden, dabei sind aber vorwiegend Peritonealmakrophagen und durch ein Mitogen stimulierte bzw. mit einem T-Zell-Antigen sensibilisierte Lymphozyten verwendet worden (34,5o,7o,81,85,88). Eine Übersicht findet sich bei HAHN und KAUFMANN (5o).

Weiterhin soll im Rahmen dieser Experimente festgestellt werden, welchen Einfluß Gentamicin auf ein solches System hat. Die Thematik der Zusammenhänge zwischen Antibiotikaeinfluß, Immunantwort und Phagozytose ist schon früher untersucht worden. Erste Versuche, mit dem Ergebnis, daß Penicillin die Phagozytosetätigkeit von Leukozyten nicht beeinflußt, gehen auf das Jahr 1941 zurück (1). Ein Überblick befindet sich bei FRUGONI (38).
In letzter Zeit wurde die Problematik neu aufgegriffen (2,35,37,46,93, Übersicht bei 45).

Bisher untersucht wurde die Einwirkung von Antibiotika auf die Phagozytose und intrazelluläre Bakterizidie, die Antikörperbildung, die Proteinsynthese sowie die Chemotaxis von Leukozyten. Die Wirkung auf Lymphozyten ist geprüft worden, indem man den Einfluß von Antibiotika auf die Lymphokinproduktion, meist MIF, gemessen hat, und zwar mit dem Makrophagen-Migrations-Hemmtest. Die Beeinträchtigung der antigen- oder mitogenabhängigen Migrationshemmung ist dabei ein Zeichen für eine Beeinträchtigung der Lymphozytenreagibilität. Man kann Einflüsse auf T- oder B-Lymphozyten differenzieren, indem man T- oder B-Zellmitogene benutzt. Sehr häufig wird auch die Wirkung von Antibiotika auf die mitogeninduzierte Transformation, gemessen am ^{3}H-Thymidineinbau in das Lymphozytengenom, verwendet (7,36).

Die Phagozytosebeeinflussung ist bei verschiedenen Antibiotika unterschiedlich. So hat man für Streptomycin in mittleren Konzentrationen (5µg/ml) eine Hemmung der Bakterienaufnahme gefunden, ebenso ist die Phagozytose von E. coli durch menschliche polymorphkernige Leukozyten bei therapeutischen Tetracyclinkonzentrationen vermindert (35,71).

Gentamicin, das in der vorliegenden Arbeit untersucht wird, hat der Literatur zufolge keinen hemmenden Einfluß auf die PHA-induzierte Transformation humaner peripherer Lymphozyten bis 5o µg/ml (7,36). Eine geringe Hemmung der durch PHA induzierten Transformation tritt bei 1000 µg Gentamicin pro ml und eine geringe Stimulierung bei 64 µg/ml auf (65,72).

Eine Stimulierung der Phagozytose durch Peritonealmakrophagen der Maus wurde von ADAM et al. bei subinhibitorischen Gentamicinkonzentrationen beobachtet. Keine Verminderung der Phagozytose, jedoch eine Hemmung der phagozytoseabhängigen Stoffwechselaktivierung (gemessen an der Freisetzung von $^{14}CO_2$ aus ^{14}C 1-Glucose), durch neutrophile Leukozyten des Menschen wurde bei 5-lo µg/ml festgestellt, während für Meerschweinchenalveolarmakrophagen eine Hemmung der Aufnahme von Bakterien ab 12,8 µg/ml beschrieben wurde (19,93). Die Antikörperbildung war bis 25 µg/ml nicht beeinträchtigt (7).

2.0. MATERIAL und METHODEN

2.1. Gewinnung von Alveolarmakrophagen

Eine in Panmixie gehaltene Meerschweinchenpopulation von Tieren, die schwerer als 8oo g waren, wurde verwandt. Vor der Lungenspülung wurden die Tiere mit einer letalen i.p. Überdosis (ca. 2oo mg/kg) Pentobarbital-Natrium (Nembutal^{R}) eingeschläfert. Sofort danach wurde unter sterilen Bedingungen die Trachea freigelegt und mit einer weitlumigen sterilen Kanüle durchstoßen. Nach Vorschieben erfolgte die Fixierung der Kanüle mittels eines Fadens (55,67,88,92). Die Lungen wurden mit 7o ml steriler balancierter Salzlösung (BSL) nach Hanks in 7 Einzelportionen (je eine lo ml-Einmalspritze) gespült (Abb. 2).

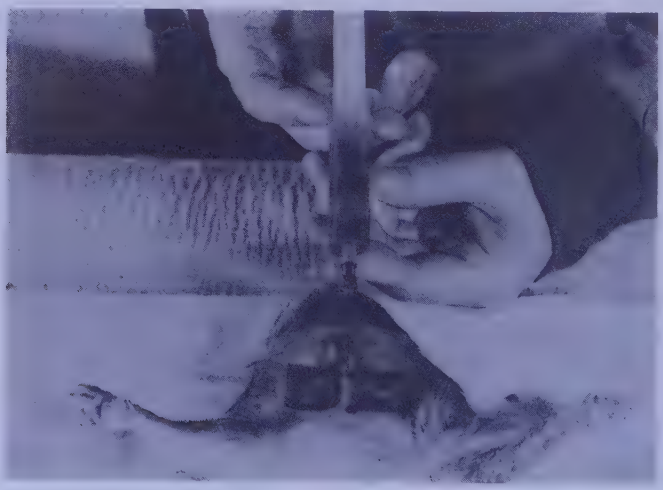

Abb. 2: Lungenspülung

Der pH wurde auf 7,4 eingestellt. Die Temperatur betrug 37°C.
Zusammensetzung der Lösung:

$Ca\ Cl_2 \times 2\ H_2O$	:	185,5 mg
K Cl	:	4oo mg
$K\ H_2\ PO_4$	:	6o mg
$Mg\ SO_4 \times 7\ H_2O$	:	2oo mg
Na Cl	:	8ooo mg

$NaHCO_3$	:	350 mg
Na_2HPO_4	:	47,5 mg
Glukose	:	1000 mg
Phenolrot	:	17 mg
aqua dest. ad	:	1000 ml

Während der Instillation der Spülflüssigkeit, die um Gewebezerreißungen zu vermeiden, nur mit geringem Druck erfolgte, und, während der mit leichtem Unterdruck ausgeführten Aspiration, wurde der Thorax des Tieres vorsichtig massiert, um eine höhere Makrophagenzahl zu gewinnen (88). Die aspirierten Einzelmengen, ca. 80% des Ausgangsvolumens, wurden gepoolt und bei 200xg zentrifugiert, bis sich der Überstand klar zeigte (ca.10 Min.). Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter "laminar air-flow". Die benutzten Glasgefäße, auch für die später beschriebene Lymphozytengewinnung, waren vorher silikonisiert und sterilisiert worden.
Nach Absaugen des Überstandes wurde das Sediment in 60 ml Hanks' - BSL resuspendiert und der Prozentsatz lebender Zellen mittels der Trypanblau-Exklusionsmethode festgestellt: 0,5 ml Trypanblaulösung (0,2%ig, in physiologischer Kochsalzlösung, Flow Lab., Bonn) wurden mit 1 ml Zellsuspension zusammengegeben (62). Nach 5 Minuten wurde die gut gemischte Suspension in eine Thoma-Zählkammer gefüllt. Tote Zellen stellten sich blau dar. Ursache dafür sind Permeabilitätsstörungen, die bei lebenden Zellen nicht auftreten. Danach konnte die Zellsuspension auf 200 000 lebende Zellen/ml verdünnt werden.

Auch wenn die Lungenspülung versuchsweise unter "laminar air flow" durchgeführt wurde, konnten die Zellkulturen nicht steril gehalten werden. Obwohl die Trachea möglichst weit distal durchstochen wurde, konnte eine Kontamination mit stets vorhandenen Keimen des oberen Respirationstraktes nicht vermieden werden. Darum wurde für 5 Stunden zu allen Kulturen Streptomycin (Streptothenat, Grünenthal, Stolberg) in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

2.2 Kultivierung von Alveolarmakrophagen

In 16 x 4o mm Polystyrolröhrchen (Greiner, Nürtingen) wurde je ein steriles rundes Deckgläschen (Durchmesser 13,5 mm) gelegt. Dann wurden je 2 ml der Zellsuspension von 2 x $1o^5$ Zellen/ml hineingefüllt. Nach 5 Stunden Inkubation bei 37°C hatten sich die Alveolarmakrophagen auf den Deckgläschen festgesetzt (14,92). Danach wurde jedes Röhrchen dreimal mit sterilem MEM Earle plus Glutamin gespült, um das Streptomycin und nicht adhärente Zellen zu entfernen (2o,92).
Zusammensetzung der Spüllösung: (pH 7,4)

$Ca\ Cl_2 \times 2\ H_2O$	:	265 mg
D (+)-Glukose x H_2O	:	11oo mg
K Cl	:	4oo mg
$Mg\ SO_4 \times 7\ H_2O$	:	2oo mg
$Na\ H_2\ PO_4 \times H_2O$	:	14o mg
Na Cl	:	68oo mg
$Na\ HCO_3$	:	22oo mg
Glutamin	:	292,3 mg
Phenolrot	:	1o,6 mg
aqua dest.ad	:	1ooo ml

Das Wachstum der Bakterien (Klebsiella pneumoniae), die in den Phagozytoseexperimenten benutzt wurden, zeigte sich auch in der letzten Teilmenge der Spülflüssigkeit nicht beeinträchtigt. Dies ist deshalb wichtig, da in einigen Veröffentlichungen Streptomycin als phagozytosehemmend beschrieben wurde (71,9o).

Als Medium für die weitere Kultivierung der Makrophagen (37°C, 5%CO_2) diente MEM Earle plus Glutamin und 1o% fetales Kälberserum, FKS, (Fa.Gibco; inaktiviert: 3o Min., 56°C). Die Röhrchen wurden jeweils bis auf 3 ml Gesamtinhalt aufgefüllt. Kontrollen nach 24 und 72 Stunden ergaben keine Kontamination mehr. Alle Phagozytoseexperimente wurden nach 24 Stunden durchgeführt.

2.3. Gewinnung und Charakterisierung von Lymphozyten

Nach der Lungenspülung erfolgte die Milzentnahme. Wenn man Lymphozyten in ihrer Gesamtheit untersuchen will, ist die Milz als Quelle für solche Zwecke sinnvoll, da in ihr alle Typen von Lymphozyten enthalten sind. Dies trifft für andere lymphatische Organe nicht unbedingt zu (33).

Die Entnahme und alle weiteren die Lymphozytengewinnung betreffenden Arbeitsschritte wurden unter "laminar air flow" durchgeführt. Nachdem die Bauchhaut des Tieres rasiert und großflächig desinfiziert war (reichlich 7o% Äthylalkohol und 2% Jodtinktur), wurden Bauchdecken und Peritoneum mit sterilem Gerät eröffnet. Durch Zug am Magen nach rechts wurde die Milz sichtbar (Abb. 3). Mit Durchtrennung des Ligamentum gastrolienale konnte die Milz am Hilus abgesetzt und herausgelöst werden (Abb. 4). Dann wurde sie sofort in ein Gefäß mit 15 ml steriler Dulbecco's phosphatgepufferter Lösung (4°C , Zusatz von 3% FKS) hineingegeben.

Zusammensetzung des Puffers:

$NaCl_2 \times 2 H_2O$	:	132,5	mg
KCl	:	2oo	mg
KH_2PO_4	:	2oo	mg
$MgCl_2 \times 6 H_2O$	:	1oo	mg
NaCl	:	8ooo	mg
Na_2HPO_4	:	115o	mg
aqua dest.ad	:	1ooo	ml

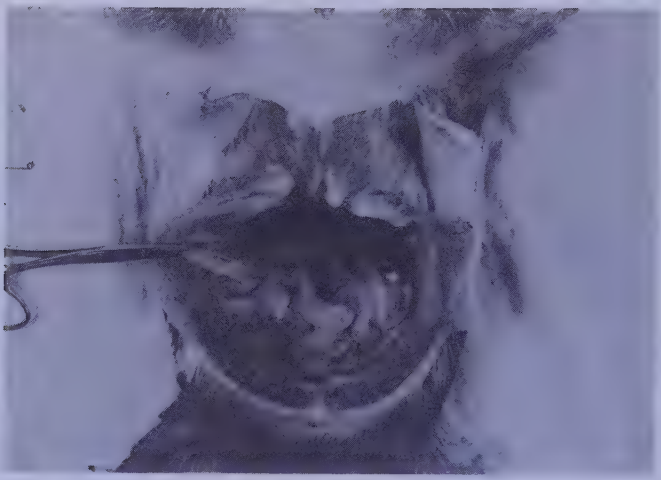

Abb. 3: Der Magen wird nach rechts weggezogen, die Milz wird sichtbar.

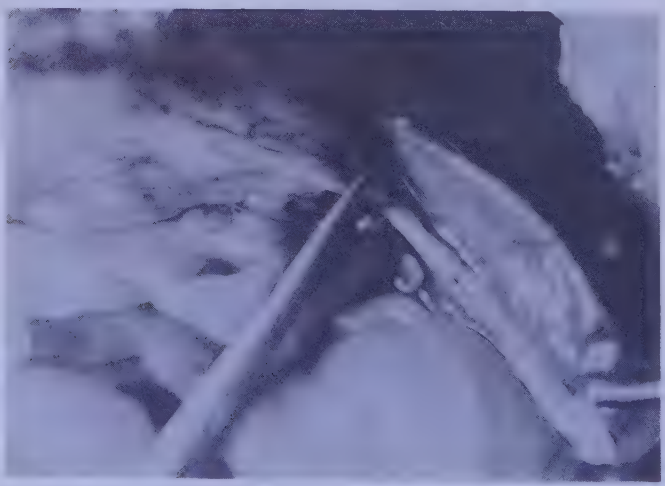

Abb. 4: Detailaufnahme. Durchtrennung des Ligamentum gastrolienale.

Die weitere Aufarbeitung der Milz erfolgte innerhalb der 5 Stunden, in denen die Makrophagen inkubiert wurden. Die Milz wurde mit einer Schere in kleine Stücke zerschnitten und diese mit Hilfe einer anatomischen Pinzette vorsichtig zerdrückt. Die Suspension aus Milzgewebe und Puffer wurde in eine unten abgeschnittene autoklavierbare Plastikspritze gegeben, an deren unterem Ende ein nicht rostendes Metallsieb mit einer Porengröße von ca. o,8 mm aufgeschweißt war. Danach wurde der Spritzenkolben unter leichtem Drehen und geringem Druck gegen das Sieb gepresst. Dadurch erhielt man eine feine Suspension von Milzgewebe ohne größere Bindegewebsanteile. Diese Suspension wurde durch eine dünne Wattelage (reine Baumwolle) filtriert. Einige ml Dulbecco's Puffer wurden vorsichtig nachgegossen, um Zellen, jedoch nicht Gewebestückchen, aus der Filterlage auszuwaschen. Dann wurde zentrifugiert (3ooxg; 4^{o}C lo Min.). Nach Absaugen des Überstandes erhielt man ein rötliches Sediment, bestehend aus Erythrozyten, Zelltrümmern, Makrophagen und Lymphozyten.

Zur selektiven Lyse der Erythrozyten genügte es nicht, wie bei FORD beschrieben, mit 1 ml trisgepufferter Ammoniumchloridlösung (2o^{o}C) das Sediment zu resuspendieren, sondern es wurden 8 ml zugegeben (33,84). Zur Lyse der Erythrozyten wurde folgende Lösung hergestellt: Neun Volumenanteile NH_4 Cl (8,3 g/l) und ein Volumenanteil Tris Base (2o,59 g/l) wurden mit 1-molarer Salzsäure auf pH 7,65 eingestellt. Der Gesamt-pH der sterilfiltrierten Lösung (Falcon-Filter-Porengröße o,22 µm) wurde auf 7,2 eingestellt. Nach lo Min. waren die Erythrozyten lysiert und der Vorgang wurde durch Zugabe von 3o ml Dulbecco's Puffer plus 3% FKS bei 4^{o}C beendet. Wiederum wurde zentrifugiert (3oo x g; 4^{o}C, lo Min.).

Zur Beseitigung der geschädigten und toten Zellen wurde das Sediment in 7,5 ml Dulbecco's Puffer plus 3% FKS mit 12,5 ml Glukoselösung und 8o ml Sorbitollösung resuspendiert und lo Min. bei 4^{o}C inkubiert. Nach VON BOEHMER et al. soll die Zuckerlösung aus Glukose und Sorbitol isoosmotisch mit dem Serum der untersuchten Tierspezies sein (11). Von den übermittelten Meerschweinchenserumosmolalitäten (K.BUROW, persönliche Mitteilung) erwies sich in Vorversuchen 288 mosmol als günstig. Dazu wurde eine Sorbitollösung von 52,46 g/l und eine Glukoselösung von 51,88 g/l hergestellt (16). Nach lo Min. Inkubation waren die beschädigten und toten Zellen verklumpt. Abschließend wurden die loo ml Zellsuspension durch eine dünne Baumwollwattelage zur Zurückhaltung der verklumpten Zelltrümmer und eine 2 cm dicke dicht gepackte Glaswollage zur Beseitigung der glasadhärenten Makrophagen langsam filtriert. Nach Zentrifugieren wurde das erhaltene Sediment in 4o ml MEM plus Glutamin und lo% FKS, ohne Antibiotikazusatz, resuspendiert.

Je 1o ml der Suspension wurden in Zellkulturflaschen (Nunc) gefüllt und bis zur Verwendung bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Vor Versuchsbeginn wurde der Prozentsatz der lebenden Zellen mittels Trypanblau-Exklusionsmethode festgestellt.

Um die Reinheit der Lymphozytenpopulation und damit die Güte des Verfahrens zu prüfen, wurden neben Phasenkontrastmikroskopie und May-Grünwald-Giemsa Färbung exemplarisch bei zwei Tieren spezifische Makrophagenfärbungen durchgeführt (88).

2.3.1. Unspezifische-Esterase-Aktivität

α-Naphthylacetat als Substrat wird durch Esterasen zu Essigsäure und α-Naphthol hydrolysiert. Wird daran ein Diazoniumsalz gekoppelt, so bildet sich ein rotbrauner Azofarbstoff. Makrophagen haben eine starke cytoplasmatische unspezifische Esteraseaktivität und färben sich daher gut an. Lymphozyten dagegen zeigen höchstens einige angefärbte Granula. Ein Tropfen Lymphozytensuspension wurde auf einem Objektträger ausgestrichen, getrocknet und mit Aceton fixiert. Dann wurden 2 ml α-Naphthylacetat (o,2 mg/ml) mit 15 ml 0,1 molarem Phosphatpuffer (pH 7,3) und 15 ml aqua dest. zusammengegeben. Dazu wurden 2o mg 4 chloro-δ-toluidin-diazotat hinzugefügt. Unter dieser Lösung wurde der Ausstrich 3o Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde er mit Wasser abgespült und zur Kerndarstellung für 1 Minute mit Methylgrün (1%ig) gegengefärbt.

2.3.2. Saure-Phosphatase-Aktivität

Die Saure-Phosphatase-Aktivität ist ein wichtiges Kennzeichen für Lysosomen. Beim Nachweis zeigen Makrophagen und Granulozyten starke Reaktion (Rotfärbung), während Lymphozyten nur schwach reagieren. Ein wie oben hergestellter und fixierter Ausstrich wurde mit folgender Lösung 3o Minuten (37°C) inkubiert: 2o ml o,1 molarer Acetatpuffer mit 2o mg Natrium-naphthylphosphat, 1,5 g Polyvinylpyrrolidon und 2o mg δ-Amino-azo-toluol-diazotat. Wie oben wurde mit Wasser abgespült und mit Methylgrün gegengefärbt.

Um die erhaltenen Lymphozyten näher kennzeichnen zu können, wurden die Zellpopulationen bei zwei Tieren exemplarisch nach B- und T-Lymphozyten differenziert.

2.3.3. Identifikation von B-Lymphozyten

Die qualitative und quantitative Identifizierung der B-Lymphozyten erfolgte durch den Nachweis von Oberflächenimmunglobulinen mittels indirekter Immunfluoreszenz (96). Die Mehrheit der B-Lymphozyten ist relativ einfach durch membranständige Immunglobuline, die als Antigenrezeptoren betrachtet werden, erfassbar. Eine andere Möglichkeit ist der Nachweis von Fc-Rezeptoren oder C_3-Rezeptoren, die sich ebenfalls auf der Oberfläche der B-Zellen befinden (8,27). Zur Phasenkontrastdarstellung eventuell vorhandener phagozytierender Zellen wurden zu einer Lymphozytensuspension von 4 x 10^6 Zellen pro ml zwei Tropfen einer 1:100 verdünnten Latexpartikelaufschwemmung (Durchmesser 1,011 µm, Firma Serva, Heidelberg) gegeben (30 Min. 37°C). Dann wurde mit Immunfluoreszenzpuffer mehrmals gespült.

Zusammensetzung des Puffers:

Stammlösung A			Stammlösung B		
Na Cl	:	80,0 g	$Na_2 HPO_4$	:	28,98 g
KCl	:	2,0 g	$KH_2 PO_4$	:	2,0 g
$Mg Cl_2 x 6 H_2O$	:	1,0 g	aqua dest. ad 1000 ml		
$Ca Cl_2 x 2 H_2O$	:	1,32 g			
aqua dest. ad 1000 ml					

Gebrauchslösung

800 ml	aqua dest.
100 ml	Stammlösung A
100 ml	Stammlösung B

hinzugefügt wurden 0,2% Natriumazid.

Zum Sediment wurden 5 Tropfen eines 1:5 verdünnten Anti-Meerschweinchen-γ-Globulins (vom Kaninchen, Firma Behring, Marburg) hinzugefügt (30 Min. 4°C). Danach wurde dreimal mit 10 ml Puffer (4°C) gewaschen und 5 Tropfen eines 1:40 verdünnten FITC- markierten Anti-Kaninchen-γ-Globulins (von der Ziege, Firma Behring, Marburg) hinzugegeben (30 Min. 4°C). Wiederum wurde dreimal mit kaltem Puffer gewaschen. Das Sediment wurde in "mounting fluid" (Firma Difco, Detroit) resuspendiert und unter dem Phasenkontrast- bzw. Fluoreszenzmikroskop (gleiche Einstellung in einem Gerät) betrachtet.

2.3.4. Identifikation von T-Lymphozyten

Die qualitative Identifikation der T-Lymphozyten erfolgte durch Nachweis der Spontanrosettenbildung mit Erythrozyten (96). Üblicherweise werden T-Zellen mittels Anti-T-Zellsera oder durch den Nachweis von Spontanrosettenbildung mit Schafserythrozyten identifiziert (59). Es hat sich aber gezeigt, daß T-Lymphozyten vom Meerschweinchen eine besondere Affinität zu Kaninchenerythrozyten besitzen (1o5). Daher wurden Kaninchenerythrozyten anstelle von Schafserythrozyten verwandt (96). Die Erythrozyten wurden mit S-(2-Aminoäthyl)isothiouronium-hydrobromid, AET, $C_3 H_{1o} N_3 S^+Br^-x$ H Br, (Firma Serva, Heidelberg) vorbehandelt (6o). AET stabilisiert die nicht immunologische Bindung zwischen T-Zellen und Erythrozyten. Die Reaktion wird dadurch reproduzierbarer und spezifischer.

2.3.4.1. Herstellung der Aminoäthylisothiouronium-hydrobromid-Erythrozyten

Zwei ml Kaninchenerythrozytensuspension, entsprechend ca. vier ml Blut, in 5o%-iger Alseverlösung wurden dreimal mit zehn ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Zu 1 ml gewaschener Erythrozyten wurden vier ml AET-Lösung (o,4o2 g in 1o ml aqua dest. pH 9) gegeben. Nach 15 minütiger Inkubation bei 37°C unter mehrmaligem Mischen und viermaligem Waschen (3x in Na Cl, 1x in Medium 199), wurden die Erythrozyten in 7 ml Medium 199 plus FKS resuspendiert. Dies entspricht ungefähr einer 1o%-igen AET-Erythrozyten Suspension (E_{AET}).

2.3.4.2. Rosettenbildung

Zu o,5 ml latexbehandelten Erythrozyten wurden o,25 ml FKS und fünf Tropfen E_{AET}-Suspension gegeben. Nach 5 Minuten leichten Zentrifugierens (25 x g) wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Sediment wurde resuspendiert und unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Als rosettenbildend wurden Lymphozyten mit mindestens 3 Erythrozyten angesehen.

2.4. Bakterien

Klebsiella pneumoniae, Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark, wurde verwendet. Diese Bakterien wurden ausgewählt, weil sie in vivo unter anderem Lungeninfektionen auslösen können, sich also auch Alveolarmakrophagen in vivo mit ihnen auseinandersetzen müssen (1o8). Klebsiellen verursachen beim Mensch 3% aller Pneumonien und sind für Meerschweinchen pathogen (99). Der verwendete Stamm zeigte Kapselbildung (92). Die Bakterien waren voll sensibel gegenüber Gentamicin und den meisten gängigen Antibiotika (Agardiffusionsmethode).

2.5. Antigenherstellung und Immunisierung

2.5.1. Gewinnung von Kapselpolysacchariden

Durch die von WESTPHAL et al. beschriebene Phenol/Wasser Extraktion erhält man weitgehend proteinfreie Exopolysaccharide und Nucleinsäuren (1o3). Mit diesen Kapselpolysacchariden sollten die Tiere immunisiert werden. Außerdem befindet sich in diesem Extrakt noch das Lipopolysaccharid der Bakterien (89).
Gleiche Mengen Phenol (90%ig) und auf Müller-Hinton-Agar vermehrte Klebsiellen, die in Na Cl (o,9%ig) suspendiert worden waren, wurden auf 68°C erhitzt, zusammengegossen und 1o Min. bei 68°C gerührt. Nach Zentrifugieren (3oooxg, 0°C, 2o Min.) wurde die obere, wässrige Phase mit den Polysacchariden vorsichtig abpipettiert und 48 Stunden gegen fließendes Leitungswasser dialysiert. Mit Anthronreagenz wurde ein Kohlenhydratanteil von 44% ermittelt und anschließend lyophilisiert (52).

2.5.2. Immunisierung

Die Meerschweinchen wurden nach folgendem Schema immunisiert:

1. Injektion (intracutan)
Emulsion aus o,18 mg Polysaccharid (= o.4 mg Lyophilisat)/kg Körpergewicht in o,5 ml o,9%iger Na Cl-Lösung + o,5 ml komplettes Freund's Adjuvans (Behring).

2. Injektion (subcutan) nach 3 Wochen (53) wie 1. Injektion nur, inkomplettes Freund's Adjuvans.

3. Injektion (subcutan) nach drei Wochen wie 2. Injektion.
Fünf Tage nach der letzten Injektion wurde Blut zur Antikörpertiterbestimmung durch Herzpunktion entnommen (53).

2.6. Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) zum Antikörpernachweis

Zum Nachweis der gebildeten Antikörper gegen K.pneumoniae Polysaccharid und zur Untersuchung, ob Lymphozyten unter den gegebenen Versuchsbedingungen Antikörper produzieren, diente der "enzyme-linked-immunosorbent-assay"(29,92).

Mit dieser Methode können Antigene und Antikörper spezifisch und in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Zur Antikörperbestimmung wird eine Kunststoffoberfläche (Festphase) mit dem Antigen beschichtet, gegen das Antikörper nachgewiesen werden sollen. Dann wird das Testserum zugegeben. Falls sich Antikörper in diesem Serum befinden, binden sie sich an das Antigen und werden beim anschließenden Waschen nicht entfernt. Dann wird ein gegen das Testserum gerichtetes enzymmarkiertes Anti-γ-Globulin hinzugegeben. Nach erneutem Waschen wird Substrat, das bei der Spaltung farbig wird, hinzugefügt. Wenn Antikörper im Testserum vorhanden waren, spaltet das über den zweiten Antikörper gebundene Enzym das Substrat. Die Farbänderung ist ein Maß für den Antikörpertiter. Die Methode wurde abgewandelt für den Nachweis von Antikörpern vom Meerschweinchen.

2.6.1. Verwendete Puffer

Coating Puffer, pH 9,6

Na_2CO_3	1,59 g
$Na\ HCO_3$	2,93 g
NaN_3	o,2 g
aqua dest.ad	1000 ml

bei 4^oC nicht länger als 2 Wochen aufzubewahren.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 2o, pH 7,4 (PBS-Tween):

Na Cl	8,o g
$KH_2 PO_4$	o,2 g
$Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$	2,9 g
KCl	o,2 g
NaN_3	o,2 g
Tween 2o	o,5 ml
aqua dest. ad	looo ml

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 2o + o,5% bovines Serumalbumin, pH 7,4 (PBS-Tween + o,5% BSA):

wie oben, Zusatz von o,5% Rinderserumalbumin

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4 (PBS)

wie oben, jedoch ohne Tween 2o

Trispuffer, pH 8,o

Tris (hydroxymethyl) aminomethan, 0,05 M

Diäthanolaminpuffer, pH 9,8

Diäthanolaminpuffer	97,o ml
aqua dest.	8oo ml
NaN_3	o,2 g
$Mg Cl_2 \times 6 H_2O$	loo mg

pH mit Salzsäure auf 9,8 einstellen, auf looo ml mit aqua dest. auffüllen. Im Dunkeln bei $4^{\circ}C$ aufbewahren.

2.6.2. Antigenbeschichtung von Mikroelisaplatten

Lyophilisat (3o mg) wurde in loo ml "Coating" Puffer gelöst. In jede Vertiefung einer Mikroelisaplatte (Dynatech, Plochingen) wurden o,2 ml dieser Lösung hineingegeben und bis zum Eintrocknen des Lösungsmittels bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Die Platten wurden bei $4^{\circ}C$ gelagert und vor Gebrauch dreimal mit PBS-Tween gewaschen.

2.6.3. Konjugatherstellung (98)

Antiserum gegen Meerschweinchen-γ-Globulin (vom Kaninchen, Behring, Marburg) wurde durch Fällung mit $Na_2 SO_4$ aufbereitet. An das Immunglobulin wurde alkalische Phosphatase gekoppelt (Boehringer, Mannheim). Eine Konjugataustestung ergab, daß es bei einer Verdünnung 1:3oo in PBS-Tween nach Substratzugabe noch zu einer optimalen Extinktion kam.

2.6.4. Antikörpertiterbestimmung im Serum

In die Vertiefungen wurden je o,2 ml des Testserums bzw. seiner Verdünnungen gegeben (vierfache Bestimmungen). Es wurde mit PBS-Tween + o,5% BSA in Zweifach-Stufen verdünnt. Als Nullwert dienten anstelle von Serum nur mit Puffer gefüllte Vertiefungen, die aber in den weiteren Schritten gleich behandelt wurden. Es folgte eine Inkubation über Nacht (feuchte Kammer, $4^{o}C$). Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween wurde in die Vertiefungen je o,2 ml Konjugat gefüllt und wie vorher inkubiert und gewaschen. Dann wurde das Substrat (lo mg p-Nitrophenylphosphat in lo ml Diäthanolaminpuffer gelöst, farblos) eingefüllt. Waren Antikörper im Testserum vorhanden, so entstand gelbes p-Nitrophenolat, dessen Extinktion 3o Minuten nach Substratzugabe direkt mit einem 8-Kanal-Photometer Multiscan (Flow Lab.) bei 4o5 nm gemessen werden konnte. Als Titer wurde die Verdünnungsstufe des Testserums angegeben, bei der noch eine signifikante (t-test, $p<0,01$) Extinktionserhöhung gegenüber dem Nullwert meßbar war.

2.6.5. Enzyme-linked-immunosorbent-assay zur Bestimmung der Antikörperproduktion durch Milzlymphozyten

KELLY et al. fanden, daß Milzlymphozyten von Mäusen, die mit dem zellulären Antigen Keyhole Limpet Haemocyanin, KLH, immunisiert worden waren, in KLH beschichteten Mikroelisaplatten Antikörper gegen KLH produzierten. In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob gegen Klebsiella-Polysaccharid nach Zugabe von Milzlymphozyten von Meerschweinchen, die mit diesem Antigen immunisiert worden waren, ebenfalls eine meßbare Antikörperproduktion stattfand.

Mikroelisaplatten wurden steril mit lo µg Polysaccharid in "Coating" Puffer (o,2 ml) pro Vertiefung beschichtet (61). Nach dem Eintrocknen wurde wie oben dreimal mit PBS-Tween gewaschen. Dann wurden Milzlymphozyten ($1 \times lo^6$ / o,2 ml) eines immunisierten Tieres (Antikörpertiter 1:looo) in MEM Earle plus Glutamin und lo% FKS in die Vertiefungen gegeben und bei 37^oC und 5% CO_2 über Nacht inkubiert. Weiter wurden die Platten, wie oben beschrieben, behandelt. Im Gegensatz zu den bei KELLY beschriebenen Experimenten wurde kein 2-Mercaptoäthanol dem Medium zugefügt, weil dieses sich auch nicht bei den Phagozytoseexperimenten im Medium befand. Lymphozyten ($6 \times lo^6$/ml) wurden in Zellkulturflaschen (Nunc) ohne und mit Antigen (lo µg/ml) in MEM plus Glutamin und lo% FKS vier Tage lang inkubiert (37^oC, 5% CO_2) (61). Danach wurde die Suspension in mit Klebsiella Polysaccharid beschichtete Mikroelisaplatten gefüllt, über Nacht inkubiert (37^oC, 5% CO_2) und weiter wie oben behandelt. Dieses Verfahren wurde mit einem nicht immunisierten Tier wiederholt.

2.7. Gentamicin

Für die Versuche wurde Gentamicinsulfat (Refobacin^R, Merck) verwendet. Das Aminoglycosidantibiotikum Gentamicin findet in der Behandlung von bronchopulmonalen Infektionen mit aeroben gramnegativen Bakterien häufige Anwendung (lol,5). Es wird bei oraler Applikation nur minimal resorbiert. Die Ausscheidung erfolgt über die Niere. Bei normaler Nierenfunktion beträgt die Plasmahalbwertzeit zwei Stunden; es wird nicht an Plasmaproteine gebunden (5). Gentamicin wirkt bakterizid, indem es durch Bindung an spezifische Rezeptoren am 3o S-Ribosom von Bakterien eine abweichende Polypeptidsynthese bewirkt. Eine intravenöse Gabe von 1-1,5 mg/kg Körpergewicht dreimal täglich wird üblicherweise als Normaldosis verabreicht. Spitzenserumkonzentrationen von 5-lo µg/ml sind erzielbar bei lebensbedrohlichen Infektionen durch gramnegative Erreger. Die mittlere Serumkonzentration beträgt o,5-1 µg/ml bei der oben angegebenen Dosierung kurz vor der nächsten Injektion. Sofort nach der Injektion können Spitzenwerte im Serum bis zu 2o µg/ml erreicht werden. Im Urin können 4 Stunden nach Applikation Konzentrationen von bis zu 3oo µg/ml gemessen werden (5).

Gentamicin ist nephrotoxisch und bewirkt mit einer Häufigkeit von 2-1o% beim Menschen, besonders bei älteren Patienten, dosisabhängige Nierenschäden. Weiterhin ist Gentamicin toxisch für den achten Hirnnerven (Häufigkeit 2-3%), wobei die Schäden am vestibulären Anteil die am cochlearen übertreffen. Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) und der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) gegenüber dem verwendeten Klebsiellen-Stamm ergab für Gentamicin eine MHK von o,15 µg/ml und eine MBK von 1,2 µg/ml (92).

2.8. Phagozytose

Die im folgenden beschriebenen Phagozytoseexperimente wurden ca.24 Stunden nach Gewinnung der Makrophagen und Lymphozyten durchgeführt. Die verwendete Bakteriensuspension enthielt 8 x $1o^6$ Bakterien/ml Medium. o,5 ml dieser Suspension wurde in Polystyrolröhrchen eingefüllt, auf deren Boden sich die Glasplättchen mit 4 x $1o^5$ Alveolarmakrophagen befanden. Damit ergab sich ein Verhältnis von 1o Bakterien pro Makrophage (92).

Die Phagozytosezeit betrug 6o Minuten (9o,92). In der Literatur werden in vergleichbaren Experimenten sowohl kürzere (1o Min., 3o Min.) als auch längere (2-5 Std.) Zeiten angegeben (34,74,85). Die Experimente wurden jeweils mit immunisierten und nicht immunisierten Meerschweinchen durchgeführt.

2.8.1. Getrennte Vorkultivierung von Makrophagen und Lymphozyten

Makrophagen und Lymphozyten wurden getrennt für 24 Stunden bei 37°C in 5% CO_2 Atmosphäre kultiviert. Dann wurde den Makrophagen o,5 ml der Bakteriensuspension und Lymphozyten in steigender Zahl zugegeben. Mit Kulturmedium wurde jeweils auf 3 ml/Röhrchen aufgefüllt und 1 Stunde zur Phagozytose bei 37°C inkubiert. In weiteren Experimenten wurden Makrophagen und Lymphozyten gemeinsam für 24 Stunden, und zwar mit und ohne Antigen (1oo µg Polysaccharid/ml) kultiviert (85).

2.8.2. Gemeinsame Vorkultivierung von Makrophagen und Lymphozyten

Lymphozyten und Makrophagen im Verhältnis 1:4, 1:1 und 4:1 wurden 24 Stunden inkubiert. Dann wurden die Lymphozyten durch fünfmaliges Waschen mit je 3 ml Medium entfernt. In der May-Grünwald-Giemsa Färbung waren keine Lymphozyten mehr sichtbar. Dann wurde o,5 ml Bakteriensuspension zugegeben. Anschließend wurde mit Kulturmedium auf 3 ml aufgefüllt und wie oben 1 Stunde inkubiert.

2.8.3. Gemeinsame Vorkultivierung von Makrophagen, Lymphozyten und Gentamicin

Lymphozyten und Makrophagen im Verhältnis von 4:1 wurden mit Gentamicin in 12 verschiedenen Konzentrationen (0-3000 µg/ml) für 24 Stunden inkubiert. Dann wurden durch fünfmaliges Waschen mit je 3 ml Medium Lymphozyten und Gentamicin entfernt. In der letzten Spüllösung wurde das Wachstum von Klebsiellen nicht gehemmt, d.h. Gentamicin war nicht mehr in wirksamen Konzentrationen nachweisbar. Weiter wurde wie unter 2.8.2. verfahren. Nach der 1-stündigen Inkubation mit Bakteriensuspension wurden die extrazellulären Bakterien durch sechsmaliges Waschen mit je 3 ml Medium entfernt (92).

In der letzten Spülflüssigkeit zeigten sich nur ausnahmsweise einzelne koloniebildende Einheiten von Klebsiellen. Dann wurde sofort mit einer auf -2o°C gekühlten Mischung aus Aceton und Methanol (1:1) fixiert und nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt, um Makrophagen und aufgenommene Bakterien darzustellen (15). Auf jedem Glasplättchen wurden die von 100 Makrophagen aufgenommenen Bakterien mikroskopisch ausgezählt, ohne daß die Identität des Präparates beim Zählen bekannt war. In allen Experimenten wurden Dreifachansätze angefertigt. Die Experimente sollten ohne Antibiotikazugabe durchgeführt werden. Dies erwies sich wegen der Vielzahl der Arbeitsschritte als äußerst schwierig. Zum Ausschluß von Kontaminationen während der Arbeitsvorgänge wurden Lymphozyten und Makrophagen in der verwendeten Zahl ohne Bakterienzusatz 24 Stunden kultiviert. Danach wurde gewaschen, fixiert und gefärbt.

Die Versuchsansätze wurden nur dann ausgewertet, wenn die Anzahl der gezählten Einschlüsse in diesen Makrophagen der Zahl der Einschlüsse bei Makrophagen entsprach, die ohne Zugabe von Lymphozyten und Klebsiellen kultiviert worden waren. Außerdem wurde ein aliquoter Teil der Lymphozytensuspension (1 ml) sowohl direkt nach der Milzaufarbeitung als auch nach zweitägiger Kultivierung im Medium auf Blut- und Müller-Hinton Agar ausgestrichen, und die Platten für 48 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.9. Statistische Berechnungen

Für alle Einzelwerte derselben Versuchsanordnung (je 3) wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt, Signifikanzberechnungen erfolgten mit dem Student's t-Test.

3.0. ERGEBNISSE

3.1. Antikörpernachweis (ELISA)

3.1.1. Antikörpertiter im Serum

Es zeigte sich, daß auch nicht immunisierte Meerschweinchen einen mit der ELISA-Technik nachweisbaren Antikörpertiter aufwiesen. Der Mittelwert der Titer von 10 Seren verschiedener Tiere betrug 1:192±9o,5. Nach der Immunisierung war der Mittelwert der Antikörpertiter auf 1:84o±169 angestiegen, gemessen bei 5 verschiedenen Tieren. Zum Vergleich wurde bei 2 weißen Neuseeland-Kaninchen die gleiche Immunisierung durchgeführt. Bei der Austestung ergab sich ein mittlerer Antikörpertiter von 1:48o im Serum vor der Immunisierung und von 1:3o72o danach. Es zeigte sich also eine für Kaninchen viel stärkere Immunogenität des hergestellten Antigens (1o3).

3.1.2. Antikörperproduktion von Lymphozyten

Experimente, in denen unbehandelte oder mit Antigen vorinkubierte Lymphozyten in mit Klebsiella Polysaccharid beschichtete Mikroelisaplatten gegeben worden waren, zeigten 3o Min. und sogar 12o Min. nach Substratzugabe keine meßbare Extinktion (61). Dies galt sowohl für Milzlymphozyten von immunisierten als auch von nicht immunisierten Tieren. Damit konnte die Produktion von Antikörpern während dieser Inkubationszeit weitgehend ausgeschlossen werden.

3.2. Charakterisierung der Zellen

Um die Frage zu beantworten, ob man durch die beschriebenen Methoden typische Zellen gewinnen konnte, mußten Makrophagen und Lymphozyten näher charakterisiert werden.

3.2.1. Alveolarmakrophagen

Die frisch gewonnenen Alveolarmakrophagen zeigten unter dem Phasenkontrastmikroskop typische ovale Form, exzentrische Kerne und stark granuliertes Zytoplasma mit Vakuolen und Einschlüssen (Abb. 5). Dies entspricht der Literatur (13,92). Auch in der May-Grünwald-Giemsa-Färbung zeigten sich regelrechte Makrophagen (Abb. 6).

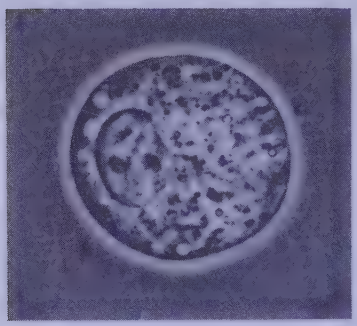

Abb.5: Alveolarmakrophage
3 Stunden nach Lungenspülung
(Phasenkontrast, 2000 x)

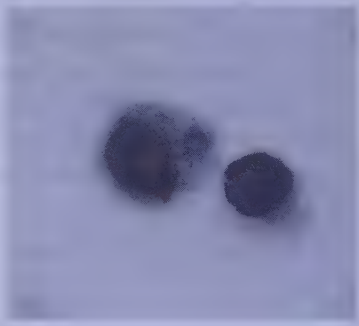

Abb.6: Zwei Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Bakteriensuspension, links mit 2 aufgenommenen Bakterien. (MGG, 1600 x)

Erst vom zweiten Tag an verschwanden die Einschlüsse. Dies ist deshalb wichtig, da die Makrophagen, auch wenn keine Klebsiellen zugegeben wurden, Bakterien enthielten. Diese mußten als immer vorhandene Grundphagozytoserate bei der Auswertung der Experimente berücksichtigt werden, stellten aber für die weitere Auswertung der Experimente keine Beeinträchtigung dar. Sie ist erklärbar durch die Phagozytosetätigkeit vor und während der fünfstündigen Inkubation.

Durch Spülung einer Lunge wurden durchschnittlich $17,7 \pm 2,7 \times 10^6$ Zellen gewonnen, von denen sich ca. 97% als vital erwiesen (Trypanblau Exklusionmethode). Nach 5 Stunden Inkubation und Waschen zeigte sich in der May-Grünwald-Giemsa-Färbung eine nahezu reine Makrophagenpopulation auf den Glasplättchen. Nach 24 Stunden hatten sich noch keine Makrophagen von ihrer Unterlage abgelöst.

3.2.2. Milzlymphozyten

Nach der Milzaufbereitung stellten sich die Lymphozyten phasenkontrastmikroskopisch in typischer Weise als kleine, runde, helle Zellen dar (Abb.7). Nur vereinzelt fanden sich als Zeichen früher Schädigung dunkle Granula in den Kernen (33). Auch die May-Grünwald-Giemsa-Färbung ergab normale Lymphozyten, meist vom kleinen Typ (Abb. 8).

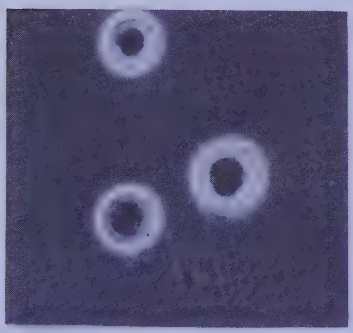

Abb.7: Lymphozyten nach Milzaufarbeitung (Phasenkontrast, 1600x)

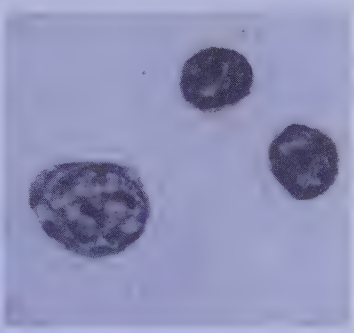

Abb.8: Lymphozyten nach 24 Stunden Inkubation. Links ein großer, rechts zwei kleine Lymphozyten (MGG, 1600x)

Die Milzen hatten ein mittleres Gewicht von o,9 g. Pro Milz wurden durchschnittlich $18,2\pm3,0x10^7$ Zellen gewonnen, von denen sich mehr als 95% als lebend erwiesen (85,91). Nach 24 Stunden waren 5% der Zellen abgestorben. Sie waren bei der ersten Zählung wahrscheinlich schon geschädigt gewesen, hatten den Farbstoff aber noch nicht aufgenommen.
Weiterhin war die absolute Zellzahl um ungefähr lo% niedriger als 24 Stunden zuvor. Dies läßt sich durch die ca. 5% toten Zellen vor der Inkubation erklären. Zusätzlich kann man annehmen, daß sich die Milzmakrophagen, von denen ein Teil unvermeidlich mit in die Lymphozytensuspension gelangte, auf dem Kulturflaschenboden festgesetzt hatten. Dies wurde durch Färbung bestätigt.
Beim Abpipettieren wurden daher fast ausschließlich Lymphozyten aufgesogen und weiter verwendet. Nach 24 Stunden gemeinsamer Inkubation von Alveolarmakrophagen und Lymphozyten konnte mikroskopisch festgestellt werden, daß sich zahlreiche Lymphozyten eng an die Makrophagen angelagert hatten (63).

Um nachzuweisen, wie gut die Milzlymphozyten nach der Aufarbeitung von Makrophagen abgetrennt worden waren, wurden spezifische Makrophagenfärbungen durchgeführt. Dabei ergab sich sowohl beim Nachweis der Aktivität der unspezifischen Esterase als auch der Aktivität der sauren Phophatase, daß die Makrophagen nicht völlig durch die Filtrierung über Glaswolle von den Lymphozyten getrennt werden konnten. Der Makrophagenanteil an der Gesamtzellzahl in der Suspension betrug aber weniger als 5% (Abb. 9 und 1o), (28).

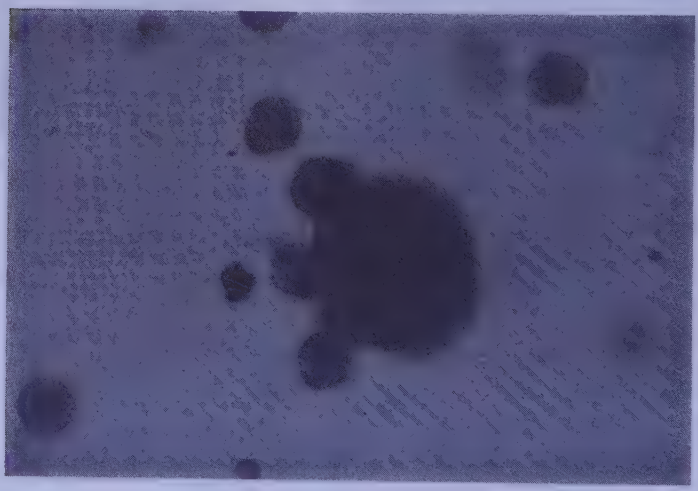

Abb. 9: Unspezifische Esterase. Das Makrophagenzytoplasma stellt sich braun dar, Lymphozyten sind grün.
Gegenfärbung: Methylgrün, 1600x.

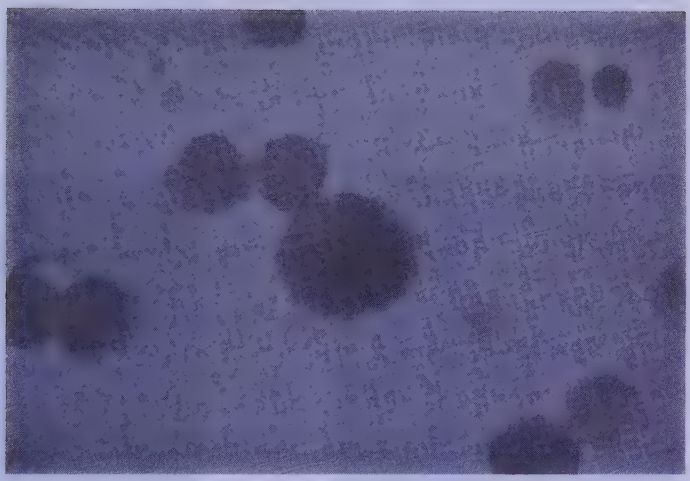

Abb. 10: Saure Phosphatase. Das Makrophagenzytoplasma stellt sich stark rot dar, das der Lymphozyten schwach rot.
Gegenfärbung: Methylgrün, 1600x.

3.2.3. Differenzierung nach T- und B-Lymphozyten

Durch Rosetten-Test und Darstellung der Oberflächenimmunglobuline konnte nachgewiesen werden, daß sich in der gewonnenen Lymphozytensuspension T- und B-Lymphozyten befanden. (Abb. 11 und 12).

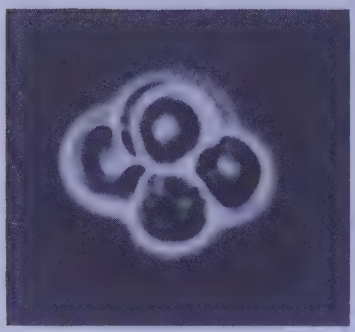

Abb.11: Rosetten-Test, 4 Erythrozyten lagern sich um einen Lymphozyten. (Phasenkontrast, 1600x)

Abb.12: Darstellung der Oberflächenimmunglobuline. (Immunfluoreszenz, 1600x)

Ca. 4o% der Lymphozyten zeigten B-Zell Charakteristika. Dies stimmt mit dem übermittelten Wert (D.THOMAS und J. NIEDERHUBER, persönliche Mitteilung) überein (91). Es ist aber möglich, daß einzelne Lymphozytenpopulationen durch das angewendete Filtrierungsverfahren überproportional zurückgehalten wurden, denn es gibt Hinweise, daß B-Lymphozyten relativ adhärenter sind als T-Zellen (3,57).

3.3. Phagozytoseexperimente

3.3.1. Getrennte Vorkultivierung von Makrophagen und Lymphozyten

Nach 24-stündiger getrennter Vorinkubation von Makrophagen und Lymphozyten wurden die beiden Zellarten zusammengegeben. Bei konstanter Zahl von Makrophagen (4×10^5) wurde die Anzahl der zugesetzten Lymphozyten ($0\text{-}2 \times 10^6$) gesteigert (Tab. 1). Nach einstündiger Inkubation zusammen mit jeweils 4×10^6 Bakterien ergab sich keine meßbare zusätzliche Phagozytosetätigkeit der Makrophagen gegenüber der Grundphagozytoserate (29,3 ± 4 aufgenommene Bakterien pro 100 Makrophagen). Dies galt sowohl für die nicht immunisierten Tiere, wie für die immunisierten Tiere (Abb. 13, Tab.1 und 2).

Makroph.	Bakt.	Lymphoz. ($\times 10^3$)	Aufgen.Bakt./ 100 Makroph. $\bar{x}$	σ_n
4×10^5	-	-	29,3	4,0
"	4×10^6	-	33,6	2,1
"	"	5	33,6	4,1
"	"	10	31,0	3,6
"	"	25	30,6	2,8
"	"	50	30,6	4,5
"	"	100	33,3	3,0
"	"	200	29,0	1,0
"	"	400	33,3	4,9
"	"	600	30,3	2,5
"	"	800	30,3	2,5
"	"	1000	28,6	2,3
"	"	1200	33,6	4,0
"	"	1400	31,6	1,5
"	"	1600	35,0	3,0
"	"	2000	29,3	4,0

Tab.1: Aufnahme von K.pneumoniae nach Zugabe verschiedener Lymphozytenzahlen; Makrophagen und Lymphozyten wurden 24 Stunden getrennt vorinkubiert, 2 nicht immunisierte Tiere, Antikörpertiter gegen K.pneumoniae im ELISA 1:128 u. 1:256

Makroph.	Bakt.	Lymphoz. ($\times 10^5$)	Aufgen.Bakt./100 Makroph. $\bar{x}$	s_n
4×10^5	-	-	29,3	2,5
"	4×10^6	-	32,0	3,6
"	"	1	33,0	3,6
"	"	4	33,0	2,6
"	"	16	31,3	2,3

Tab. 2: Aufnahme von K.pneumoniae nach Zugabe verschiedener Lymphozytenzahlen; Makrophagen und Lymphozyten wurden 24 Stunden getrennt vorinkubiert, immunisiertes Tier. Anstieg des Serumantikörpertiters gegen K.pneumoniae im ELISA von 1:64 auf 1:960

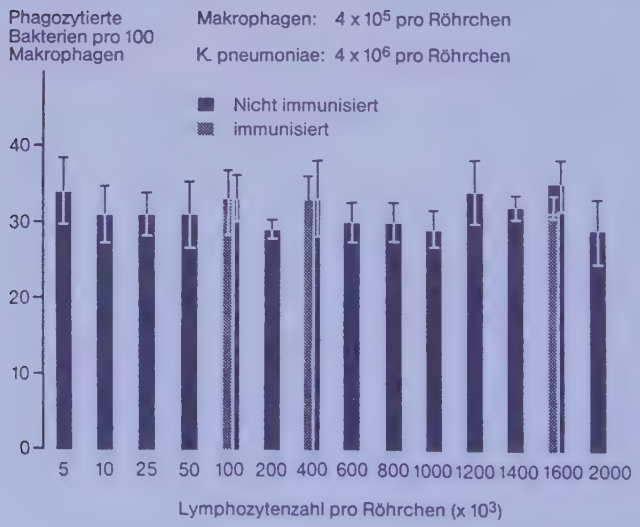

Abb. 13: Aufnahme von K.pneumoniae nach Zugabe verschiedener Lymphozytenzahlen; Makrophagen und Lymphozyten wurden 24 Stunden g e t r e n n vorinkubiert, zwei nicht immunisierte Tiere, ein immunisiertes Tier, Mittelwert und Standardabweichungen s.Tab. 1 und 2

Es trat ebenfalls keine Steigerung des Phagozytose ein, bei einer Lymphozytenzahl von $2x10^6$ aber doppelter Zahl zugegebener Bakterien (Daten nicht aufgeführt).

3.3.2. Gemeinsame Vorkultivierung von Makrophagen und Lymphozyten

Wenn Makrophagen vor der Inkubation mit Bakterien 24 Stunden mit unterschiedlichen Zahlen von Lymphozyten inkubiert worden waren, zeigte sich abhängig von der Lymphozytenzahl eine Steigerung der Phagozytoserate, die sich bei einem Verhältnis 1:4 von Makrophagen zu Lymphozyten als signifikant ($p<0.05$) gegenüber der Grundphagozytoserate erwies (Abb. 14, Tab. 3).

Die absolute Steigerung der Aufnahme lag unter 30 Bakterien/100 Makrophagen. Ein Anstieg, wie er bei Antikörperzugabe zu verzeichnen war, konnte allerdings auch nicht erwartet werden, da bekapselte Bakterien erst durch Opsonisierung ausreichend gut phagozytiert werden (43,71,92). Die gezeigte Steigerung hätte man auf Antikörperbildung durch die Lymphozyten zurückführen können.

Zum Nachweis eventuell gebildeter Antikörper gegen Klebsiellen wurde die mit Makrophagen 24 Stunden inkubierte Lymphozytensuspension ($1,6 \times 10^6$) in mit Klebsiella-Polysaccharid beschichtete Elisaplatten gefüllt und weiter wie bei der Antikörperbestimmung von Serum verfahren. Dabei ergab sich kein Anhalt für Antikörperbildung während der Vorinkubation (keine meßbare Extinktion). Weiterhin wurde in der Annahme, von den Lymphozyten sezernierte Lymphokine könnten für die Phagozytosesteigerung verantwortlich sein, der Überstand einer entsprechenden Lymphozytensuspension zu nicht mit Lymphozyten inkubierten Makrophagen (1 Stunde zusammen mit Klebsiellen) gegeben. Es ergab sich keine gegenüber der Grundphagozytoserate erhöhte Phagozytose.

Makroph.	Bakt.	Lymphoz. ($\times 10^5$)	Aufgen.Bakt./100 Makroph. $\bar{x}$	s_n
4×10^5	-	-	26,0	2,6
"	4×10^6	-	30,0	2,5
"	"	1	32,0	4,3
"	"	4	33,3	1,5
"	"	16	52,6	3,0

Tab.3: Aufnahme von K.pneumoniae nach Zugabe verschiedener Lymphozytenzahlen; Makrophagen und Lymphozyten wurden 24 Stunden gemeinsam vorinkubiert. Nicht immunisiertes Tier. Antikörpertiter gegen K.pneumoniae im ELISA 1:64.

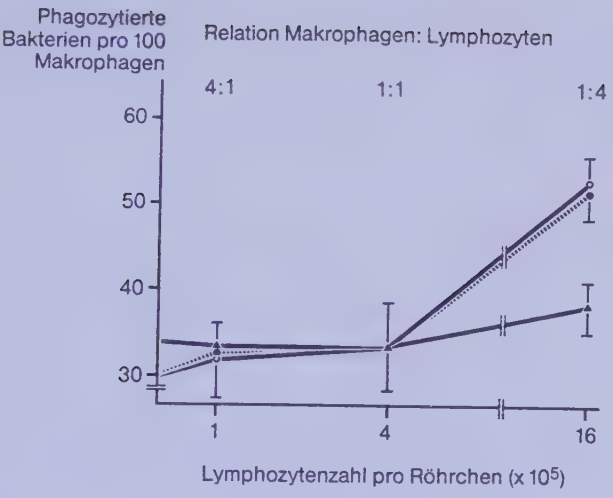

Abb. 14: Aufnahme von K. pneumoniae nach Zugabe verschiedener Lymphozytenzahlen. Mittelwerte und Standardabweichungen s. Tab.1, 3 und 4

o——o nicht immunisiertes Tier; Makrophagen und Lymphozyten wurden 24 Stunden g e m e i n s a m vorinkubiert

•- - -• nicht immunisiertes Tier; Makrophagen, Lymphozyten und Antigen wurden 24 Stunden g e m e i n s a m vorinkubiert

▲——▲ nicht immunisiertes Tier; Makrophagen und Lymphozyten wurden 24 Stunden g e t r e n n t vorinkubiert

3.3.3. Gemeinsame Vorkultivierung von Makrophagen, Lymphozyten und Antigen

Weder die Verwendung eines Tieres, das vorher mit Klebsiella Polysaccharid immunisiert worden war, noch Antigenzugabe (100 µg Polysachcharid/ml) zu Makrophagen und Lymphozyten während der 24-stündigen Vorinkubation, hatten einen Einfluß auf die in Abschnitt 3.3.2. beschriebene Steigerung der Phagozytoserate. Dies wird in den Abbildungen 14 und 15 und den dazugehörigen Tabellen 4,5 und 6 dargestellt.

Makroph.	Bakt.	Lymphoz. ($\times 10^5$)	Antigen (ml)	Aufgen.Bakt./100 Makroph. $\bar{x}$	σ_n
4×10^5	-	-	-	26,0	2,6
"	4×10^6	-	-	30,0	2,5
"	"	1	0,5	32,3	2,6
"	"	4	0,5	33,3	3,0
"	"	16	0,5	51,6	3,0

Tab. 4: Aufnahme von K.pneumoniae nach Zugabe verschiedener Lymphozytenzahlen. Makrophagen, Lymphozyten und Antigen (100 µg/ml) wurden 24 Stunden gemeinsam vorinkubiert. Nicht immunisiertes Tier. Antikörpertiter gegen K.pneumoniae im ELISA 1:64

Makroph.	Bakt.	Lymphoz. ($\times 10^5$)	Aufgen.Bakt./100 Makroph. $\bar{x}$	σ_n
4×10^5	-	-	29,3	2,5
"	4×10^6	-	32,0	3,6
"	"	1	36,6	2,5
"	"	4	36,0	4,0
"	"	16	49,3	2,1

Tab. 5: Aufnahme von K.pneumoniae nach Zugabe verschiedener Lymphozytenzahlen; Makrophagen und Lymphozyten wurden 24 Stunden gemeinsam vorinkubiert. Immunisiertes Tier. Anstieg des Serumantikörpertiters gegen K.pneumoniae im ELISA von 1:64 auf 1:960

Makroph.	Bakt.	Lymphoz. (x 10^5	Antigen ml	Aufgen.Bakt./100 Makroph. $\bar{x}$	σ_n
4×10^5	-	-	-	29,3	2,5
"	4×10^6	-	-	32,0	3,6
"	"	1	0,5	32,3	2,1
"	"	4	0,5	36,6	3,0
"	"	16	0,5	48,3	1,5

Tab. 6: Aufnahme von K.pneumoniae nach Zugabe verschiedener Lymphozytenzahlen; Makrophagen, Lymphozyten und Antigen (100 µg/ml) wurden 24 Stunden gemeinsam vorinkubiert. Immunisiertes Tier. Anstieg des Serumantikörpertiters gegen K.pneumoniae im ELISA von 1:64 auf 1:960

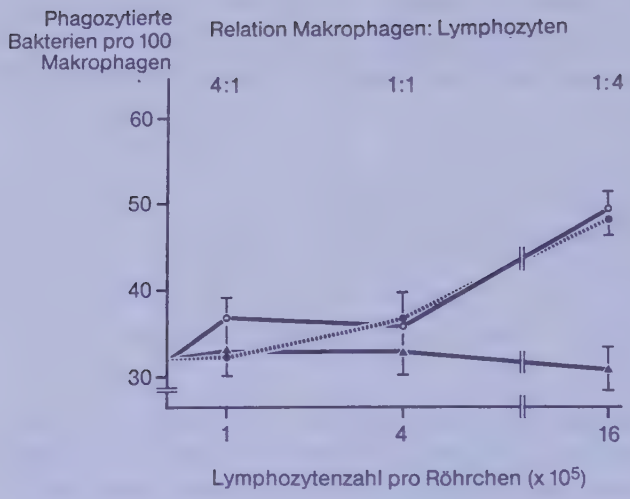

Abb. 15: Aufnahme von K.pneumoniae nach Zugabe verschiedener Lymphozytenzahlen. Mittelwerte und Standardabweichungen s.Tab. 2, 5 und 6.

o——o immunisiertes Tier; Makrophagen und Lymphozyten wurden 24 Stunden g e m e i n s a m vorinkubiert

•– – –• immunisiertes Tier; Makrophagen, Lymphozyten und Antigen (100 ug/ml) wurden 24 Stunden g e m e i n s a m vorinkubiert

▲——▲ immunisiertes Tier; Makrophagen und Lymphozyten wurden 24 Stunden g e t r e n n t vorinkubiert

3.3.4. Gemeinsame Vorkultivierung von Makrophagen, Lymphozyten und Gentamicin

Zu Lymphozyten ($1{,}6 \times 10^6$) und Makrophagen (4×10^5), also dem Verhältnis, das in den vorherigen Experimenten eine signifikante Phagozytosesteigerung gezeigt hatte, wurde für die 24-stündige Inkubationszeit Gentamicin in 12 verschiedenen Endverdünnungen von 0-3000 µg/ml zugegeben. 3000 µg/ml ist die zytotoxische Konzentration, d.h. die Konzentration, die in einer L-Zellen Suspensionskultur die Zellvermehrung um 50% reduziert (78).
Ab einer Gentamicinkonzentration von 2,92 µg/ml ergab sich im Vergleich zu Kulturen ohne Gentamicinzusatz eine signifikante ($p<0{,}05$) Reduzierung der Phagozytosesteigerung (Tab.7 Abb.16). Bei 3000 µg/ml war keine Steigerung der Phagozytose mehr nachweisbar. Das gleiche zeigte sich bei Verwendung eines immunisierten Tieres (Tab. 8, Abb. 16).

Makroph.	Bakt.	Gentamicin µg/ml	Lymphoz. ($\times 10^5$)	Aufgen.Bakt./100 Makroph. $\bar{x}$	σ_n
4×10^5	-	-	-	25,6	3,2
"	4×10^6	-	-	30,3	1,5
"	"	3000	16	33,6	3,5
"	"	750	"	33,6	1,1
"	"	187,5	"	32,3	2,5
"	"	46,87	"	38,6	5,6
"	"	11,71	"	39,0	1,0
"	"	2,92	"	51,3	4,1
"	"	0,73	"	59,6	2,5
"	"	0,18	"	58,3	3,0
"	"	0,045	"	56,6	3,5
"	"	0,011	"	56,6	2,1
"	"	0,003	"	58,3	1,5
"	"	-	"	51,3	4,5

Tab.7: Aufnahme von K.pneumoniae nach variablen Gentamicinkonzentrationen. Makrophagen, Lymphozyten und Gentamicin wurden 24 Stunden gemeinsam vorinkubiert. Nicht immunisiertes Tier. Antikörpertiter gegen K.pneumoniae im ELISA 1:128

Makroph.	Bakt.	Gentamicin (µg/ml)	Lymphoz. (x 10^5)	Aufgen.Bakt./100 Makroph. $\bar{x}$	σ_n
4 x 10^5	-	-	-	27,6	1,5
"	4 x 10^6	-	-	30,6	1,1
"	"	3000	16	31,6	1,5
"	"	750	"	34,3	2,5
"	"	187,5	"	34,6	3,0
"	"	46,87	"	38,3	3,7
"	"	11,71	"	42,3	2,3
"	"	2,92	"	41,6	3,5
"	"	0,73	"	59,0	3,6
"	"	0,18	"	56,0	2,6
"	"	0,047	"	56,0	1,0
"	"	0,011	"	55,6	2,1
"	"	0,003	"	58,0	2,6
"	"	-	"	57,6	3,0

Tab. 8: Aufnahme von K.pneumoniae nach variablen Gentamicinkonzentrationen; Makrophagen, Lymphozyten und Gentamicin wurden 24 Stunden gemeinsam vorinkubiert. Immunisiertes Tier. Anstieg des Serumantikörpertiters gegen K.pneumoniae im ELISA von 1:128 auf 1:1024

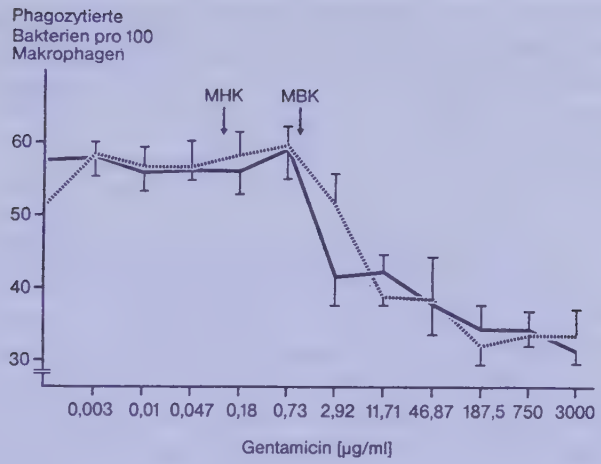

Abb. 16: Aufnahme von K.pneumoniae nach variablen Gentamicinkonzentrationen; Makrophagen, Lymphozyten und Gentamicin wurden 24 Stunden gemeinsam vorinkubiert. Immunisiertes ●—● und nicht immunisiertes ●– –● Tier. Mittelwerte und Standardabweichungen s. Tab. 7 und 8.

4.0. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß von Lymphozyten auf die Phagozytose von Klebsiella pneumoniae durch autologe Alveolarmakrophagen sowohl in einem antibiotikafreien System als auch unter Gentamicineinfluß zu untersuchen. Dazu wurden Milzlymphozyten vom Meerschweinchen verwendet. Diese konnten durch das beschriebene Verfahren in nahezu reiner (>95%) Population gewonnen werden. Zwar wurde den Makrophagen für 5 Stunden Streptomycin zugesetzt, aber, wie gezeigt, durch mehrmaliges Waschen völlig entfernt. Auch wird Streptomycin in meßbaren Konzentrationen von Makrophagen erst nach längerer Inkubation (erheblich länger als 5 Stunden) aufgenommen (12).

Wenn man zu Makrophagen und K.pneumoniae Antikörper gegen die Klebsiellen hinzugibt, so ist schon nach kurzer Zeit (weniger als eine Stunde) ein starker Anstieg der Phagozytosetätigkeit der Makrophagen zu verzeichnen (92). Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit keine Antikörper, sondern Lymphozyten zu den Makrophagen gegeben. Es zeigte sich, daß erst nach 24-stündiger gemeinsamer Vorinkubation von Makrophagen und Lymphozyten die Aufnahme von K.pneumoniae durch die Alveolarmakrophagen anstieg, und zwar mit steigender Lymphozytenzahl. Die Makrophagen waren also zu einer größeren Phagozytoseleistung aktiviert worden.

MACKANESS benutzte den Begriff "Makrophagen Aktivierung", um die gesteigerte bakterizide Fähigkeit zu beschreiben, die Makrophagen während einer Infektion mit fakultativ intrazellulären Bakterien erlangen (64). In solchen Systemen wurde die Aktivierung der Makrophagen über Lymphokine von Lymphozyten erklärt; sie zeigte sich in der Steigerung von Glasadhärenz, ^{14}C-Glukoseoxidation, Bakterizidie, Proteinsynthese und Phagozytosetätigkeit (74). Auch die von FOWLES et al. beobachtete Makrophagenaktivierung läßt sich durch Lymphokine erklären. Diese Autoren beschrieben eine gesteigerte intrazelluläre Bakterizidie für Listeria monocytogenes aber keine vermehrte Phagozytose, wenn Makrophagen 24 Stunden mit Lymphozyten inkubiert wurden, die gegen an Rinder-Gammaglobulin gekoppeltes Ortho-chlorbenzoyl sensibilisiert worden waren.

Wenn Makrophagen und Lymphozyten zusätzlich gemeinsam mit an Rinder-Gammaglobulin gekoppeltes Ortho-chlorbenzoyl inkubiert worden waren, erhöhte sich die Fähigkeit der Makrophagen, die intrazellulären Bakterien abzutöten,noch weiter. Dabei nahm die Bakterizidie mit steigender Lymphozytenzahl zu, bis zu einem Verhältnis Lymphozyten zu Makrophagen von 1:1o (34).

In der vorliegenden Arbeit bewirkte die Antigenzugabe zu dem System von Makrophagen und Lymphozyten und die vorherige Immunisierung der Tiere mit Klebsiella-Polysaccharid keine Steigerung der Phagozytoserate. Es muß aber dabei in Betracht gezogen werden, daß es sich bei dem Polysaccharid von Klebsiellen um ein Antigen handelt, das im Gegensatz zu dem bei FOWLES et al.benutzten Antigen die humorale Immunantwort (Antikörperbildung) steigert und,wie in den beschriebenen Versuchen gezeigt wurde, ein schlechtes Immunogen für Meerschweinchen, gemessen am Serumantikörpertiter im ELISA, ist. Die geringe Immunogenität des Antigens für Meerschweinchen wurde zusätzlich dadurch bestätigt, daß bei den Experimenten, in denen Lymphozyten in antigenbeschichtete Vertiefungen von Elisaplatten gefüllt worden waren, die Lymphozyten keine meßbaren Antikörper freisetzten. KELLY et al.konnten Antikörperproduktion von gegen Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH) sensibilisierten Lymphozyten, die in mit KLH beschichtete Vertiefungen von Elisaplatten gefüllt worden waren, nachweisen. Daß in der vorliegenden Arbeit keine aus den Lymphozyten freigesetzten Antikörper nachgewiesen werden konnten, läßt sich vielleicht auch dadurch erklären, daß bei den beschriebenen Versuchen im Gegensatz zu den Ansätzen bei KELLY et al.dem Medium kein 2-Mercaptoäthanol zugefügt worden war (61). Dies geschah, um mit dem gleichen Medium wie für alle anderen dargestellten Experimente zu arbeiten. 2-Mercaptoäthanol stimuliert nach OPITZ et al.über einen Serumfaktor Lymphozyten (75).

Es muß diskutiert werden, ob Lipopolysaccharid für die gesteigerte Phagozytosetätigkeit der Makrophagen verantwortlich ist. Lipopolysaccharid kann Makrophagen sowohl direkt als auch über Lymphozytenstimulation aktivieren. Außerdem kann es Makrophagen auch direkt supprimieren.

Die in Phenol-Wasser Extrakten von Klebsiellen enthaltene LPS-Fraktion führte nicht zu einer Makrophagenaktivierung. Dies ist durch die Kürze der Einwirkdauer und die geringe Konzentration von LPS in der verwendeten Präparation erklärbar (77,89).

Die beobachtete Makrophagenaktivierung ist am ehesten durch den mit ansteigender Lymphozytenzahl vermehrten antikörper- und antigenunabhängigen Zell-Zell-Kontakt von Makrophagen und Lymphozyten zu erklären. RIISGAARD et al. zeigten, daß dieser Kontakt makrophagenaktivierend wirkt, und zwar in einem System, das ein Antigen enthält, welches die zelluläre Immunantwort steigert (81). Die beschriebenen Versuche geben Hinweis darauf, daß Ähnliches auch für ein System gelten könnte mit Lymphozyten, die nicht durch ein T-Zell Antigen stimuliert wurden.

Eine an den Kontaktstellen von Makrophagen und Lymphozyten lokalisierte, bei der Kontrolle des Suspensionsüberstandes nicht gemessene, Lymphokinproduktion läßt sich nicht ausschließen. Diese lokalisierte Lymphokinproduktion könnte zur Makrophagenaktivierung beigetragen haben und ließe sich durch das Vorhandensein von fetalem Kälberserum (FKS) im Medium erklären. FKS kann der Literatur zufolge stimulierend auf Lymphozyten wirken (58). Homologes Serum wurde nicht zugegeben, weil die ELISA-Versuche gezeigt hatten, daß auch im Serum nicht immunisierter Tiere Antikörper gegen Klebsiella Polysaccharid vorhanden waren. Die Antikörper könnten durch kreuzreagierende Antigene induziert worden sein.

Für weitere Untersuchungen wäre es interessant, z.B. mit Latexpartikeln nachzuprüfen, ob die Phagozytosesteigerung unspezifischer Natur ist und wie noch höhere Lymphozytenzahlen sie beeinflussen.

Gerade in letzter Zeit ist die Beeinflussung immunologischer Vorgänge durch Chemotherapeutika, insbesondere Antibiotika, erneut in den Blickpunkt des Interesses getreten (Kap.1.0.). In den vorher dargestellten Untersuchungen wurden daher zunächst keine Antibiotika zugesetzt.

Wurden Gentamicin (0-3000 µg/ml), Makrophagen und optimal wirksame Lymphozytenzahlen gemeinsam vorinkubiert, so zeigte sich schon ab einer Konzentration von 2,92 µg Gentamicin pro ml, also durchaus im Bereich gebräuchlicher Serumspiegel, ein signifikanter Abfall der Bakterienaufnahme in die Makrophagen im Vergleich zu einer Zellpräparation, der kein Gentamicin zugesetzt worden war. Bei zytotoxischen Werten von 3000 µg/ml war, wie zu erwarten, keine Steigerung der Phagozytoserate mehr meßbar. Obwohl ein ähnliches Lymphozyten-Makrophagen System noch nicht untersucht wurde, wurde doch an anderer Stelle beschrieben, daß gerade Gentamicin, mehr als andere Aminoglycosidantibiotika, in das immunologische System eingreift (19). So ist bekannt, daß Gentamicin ab 5 µg/ml die candidacide Aktivität menschlicher neutrophiler Leukozyten vermindert, obwohl bekanntermaßen Candida selbst nicht von dem Antibiotikum beeinflußt wird (32). Außerdem weiß man, daß Gentamicin bis 10 µg/ml zwar nicht die Phagozytosetätigkeit menschlicher Leukozyten selbst, aber die phagozytoseabhängige Stoffwechselaktivierung hemmt und ab 12,8 µg Gentamicin pro ml ein Rückgang der Bakterienaufnahme bei Alveolarmakrophagen vom Meerschweinchen verzeichnet wird (19,93). Bei diesen Versuchen wurde Gentamicin, im Unterschied zur vorliegenden Arbeit, immer während der Phagozytosephase zugegeben.

Zur Erklärung der Gentamicinwirkung in früheren Experimenten und auch der Hemmung der Phagozytosesteigerung in den eigenen Versuchen könnte eine Beobachtung von WILHELM et al. beitragen: die Autoren beschrieben nach Gentamicinzugabe einen Kodierungsdefekt während der Translation natürlicher Überträgermoleküle, und zwar in Extrakten kultivierter humaner Zellen (104). Der Nachweis, daß diese Wirkung von Gentamicin nicht alleine auf Prokaryonten beschränkt ist, läßt es möglich erscheinen, daß die Hemmung der in den vorliegenden Experimenten beschriebenen Phagozytosesteigerung eventuell über Eingriffe in die Proteinsynthese von Makrophagen und/oder Lymphozyten abläuft. So könnte auch eine mögliche lokalisierte Lymphokinproduktion so wie die Wirkung auf die Zielzelle über den gleichen Mechanismus beeinflußt werden (82).

Trotz der bekannt schwierigen Übertragbarkeit der Ergebnisse von Tierversuchen auf den Menschen und unter dem Vorbehalt, daß die erwähnte Phagozytosesteigerung gegenüber der durch Antikörper bedingten Steigerung absolut gesehen nur gering ist, kann diese Untersuchung vielleicht einen Beitrag leisten zur Erklärung der Beobachtung, daß die entsprechenden Antibiotika trotz bestehender in vitro Empfindlichkeit des Erregers in ihrer Wirkung eingeschränkt sind (45). Dies muß insbesondere dann angenommen werden, wenn die beschriebene negative Beeinflussung des Abwehrsystems noch auf eine schon vorhandene zelluläre Immundefizienz (zytostatikabehandelte Tumorpatienten) trifft.

5.0. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war es, den Einfluß von Milzlymphozyten vom Meerschweinchen auf die Phagozytose von Klebsiella pneumoniae durch autologe Alveolarmakrophagen sowohl in einem antibiotikafreien Versuchssystem als auch nach Gentamicinzugabe zu untersuchen. Typische vitale Makrophagen und sowohl B- als auch T-Lymphozyten wurden verwendet. Nach 24-stündiger getrennter Vorinkubation von Makrophagen und Lymphozyten, kam es bei Lymphozytenzugabe nicht zur Steigerung der Phagozytosetätigkeit der Makrophagen. Erst wenn die Makrophagen 24 Stunden gemeinsam mit den Lymphozyten vorinkubiert worden waren, zeigte sich eine gesteigerte Aufnahme von K.pneumoniae durch die Alveolarmakrophagen. Die Zunahme der Phagozytosetätigkeit war direkt korreliert mit der Lymphozytenzahl. Diese Ergebnisse konnten am ehesten durch den vermehrten antikörper- und antigenunabhängigen Zell-Zell-Kontakt von Makrophagen und Lymphozyten erklärt werden, denn auch die Zugabe von Klebsiella Polysaccharid während der 24-stündigen Vorinkubation oder die Verwendung von gegen Klebsiella Polysaccharid immunisierter Tiere hatten keinen Einfluß auf dieses Phänomen. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, daß auch bei nicht immunisierten Tieren Antikörper gegen Klebsiella Polysaccharid nachweisbar waren.

Gentamicinzugabe während der 24-stündigen Vorinkubation hemmte die Phagozytosesteigerung schon ab Konzentrationen von 2,92 µg Gentamicin/ml Medium, also im Bereich gebräuchlicher Serumkonzentrationen. Die Hemmung der Phagozytosesteigerung könnte durch gentamicinbedingte Eingriffe in die Proteinsynthese von Makrophagen und/oder Lymphozyten erklärt werden.

Die vorliegenden Befunde könnten dazu beitragen, den Einfluß von Antibiotika auf die körpereigenen Abwehrvorgänge weiter aufzuklären.

6.0. Literaturverzeichnis

1) ABRAHAM, E.P.,CHAIN, E.FLECHTER, L.M., FLOREY, H.W., GARDNER, A.D., HEATLEY, N.G., JENNINGS, M.A.,
Lancet 241 (II):177 (1941)

2) ADAM, D., PHILIPP, P.,' BELOHRADSKY, B.H.
Effect of antibiotics on phagocytosis of mouse-peritoneal-macrophages in vitro.
Aerztl.Forsch. 25:181 (1971)

3) ADAMS, P.B. Biological charakterisation of T- and B-lymphocytes separated from normal mouse spleen by a physical adherence column method
Cell.Immunol. 8:372 (1973)

4) ALLISON,A.C., Mechanisms by which activatet macrophages inhibit lymphocyte responses.
Immunological Rev. 4o:4 (1978)

5) APPEL,G.B.,NEU,H.C.,Gentamicin in 1978;
Annals of Internal Medicine 89 No.4 :528 (1978)

6) ASCHOFF,L.
Das reticuloendotheliale System.
Ergeb. Inn.Med. Kinderheilk. 26:1 (1924)

7) BANCK,G.FORSGREN,A.,Antibiotics and suppression of lymphocyte function in vitro.
Antimicrob Agents Chemother. 16:554 (1979)

8) BIANCO,D.,PATRICK,R.,NUSSENZWEIG,V.: A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes.
J.Exp.med. 132:702 (1970)

9) BLOOM,B.R.,BENNT,B.,Mechanism of reaction in vitro associated with delayed type hypersensivity
Science 135:80 (1966)

10) BLUSSE VAN OUD ALBLAS, A., FURTH VAN, R. The origin of pulmonary macrophages
Immunobiol. 161:186 (1982)

11) BOEHMER VON, H. SHORTMAN, K., The separation of different cell classes from lymphoid organs. IX. A simple and rapid method for removal of damaged cells from lymphoid cell suspensions.
J. immunol. Method. 2:293 (1973)

12) BONVENTRE, P.F., IMHOFF, J.G.
Uptake of ^{3}H-Dihydrostreptomycin by macrophages in culture.
Infect. Immun. 2:89 (1970)

13) BOWDEN, D.H.
The alveolar macrophage
Curr. Top. Pathol. 55:1 (1971)

14) BRAIN, J.D., GOLDE, D.W., GREEN, G.M., MASSARO, D.J., VALBERG, P.A., WARD, P.A., WERB, Z.
Biologic potential of pulmonary macrophages.
Am. Rev. Respir. Dis. 118:435 (1978)

15) BURCK, H.C.
Histologische Technik.
2. Aufl., Thieme, Stuttgart S.119 (1969)

16) BUROW, K. Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover
Persönliche Mitteilung (1979)

17) CANTOR, H.
The effect of anti-theta antiserum upon graft versus host activity of spleen and lymphnode cells
Cell. Immunol. 3:461 (1972)

18) CLAMAN, H.N., CHAPERON, E.A., TRIPLETT, R.F.
Immunocompetence of transferred thymus-marrow cell combinations.
J. Immunol. 92:828 (1966)

19) CLIVIO, A., FERRARI, F.A., PAGANI, A., MANTOVANI, G., SICCARDI, A.G.,
In vitro effect of aminoglycoside antibiotics (gentamicin, sisomicin and netilmicin) on human leucocyte functions;
IRCS Med.Sci. 6:306 (1978)

20) COHEN, A.B., CLINE, M.J.
The human alveolar macrophage:isolation, cultivation in vitro and studies of morphologic and functional characteristics
J.Clin.Invest. 50:1390 (1971)

21) COHN, Z.A., HIRSCH, J.G.
Phagocytic cells. In bacterial and myocytic infections of man, eds. Dubois R.J. and Hirsch, J.G., Philadelphia: Lippincott (1965)

22) COHN, Z.A., Prosperties of macrophages. in: Phagocytic mechanisms in health and disease. Ed. by WILLIAMS, R.C., FUDENBERG, H.H.
1. Aufl., Thieme, Stuttgart, p.39 (1972)

23) CONE, R.E., FELDMANN, M., MARCHALONIS, J.J., NOSSAL, G.J.V.
Cytophilic prosperties of surface immunoglobulin of thymus derived lymphocytes
Immunology 26:49 (1974)

24) COSENZA, H., LESERMANN, L.D., ROWLEY, D.A. The third cell type required for the immune response of spleen cells in vitro.
J.Immunol. 107:414 (1971)

25) BUTTERWORTH Medical Dictionary
2nd edition, Butterworth, London, Boston; p 1290 (1978)

26) DAVID, J.R.,
Delayed hypersensitivy in vitro and its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction
Proc.Nat.Acd. USA 56:72 (1966)

27) DICKLER, H.B., KUNKEL, H.G.,
Interaction of aggregated γ-globulin with B-lymphocytes
J.Exp.Med. 136:191 (1972)

28) DOUGLAS,S.D.
III Culture methods for the study of growth of human lymphocytes
Intern.Rev.Exp.Path. 10:53 (1971)

29) ENGVALL,E.,PERLMANN,P.
Enzyme-linked-immunosorbent-assay(ELISA) III.Quantitation of
specific antibodies by antigen-coated tubes.
J.Immunol. 109:129 (1972)

30) FELDMANN,M.
Cell interactions in the immune response in vitro.II.
The requirement for macrophages in lymphoid cell collaboration
J.Exp.Med. 135:1049 (1972b)

31) FELDMANN,M.,SCHRADER,J.W.,BOYLSTON,A.
Macrophage-lymphocyt interaction in vitro.In:Mononuclear Phagocytes
Ed.:VAN FURTH,R.,Blackwell Sic.Publ.,Oxford p 779 (1975)

32) FERRARI,F.A.,PAGANI,A.,MARCONI,M.,STEFANONL,R.,SICARDI,A.G.
Inhibition of candidacidal activity of human neutrophil
leukocytes by aminoglycoside antibiotics.
Antimicrob.Agents Chemother. 17:84 (1980)

33) FORD,W.L.
Testing the viability of lymphocytes,in:Handbook of experi-
mental Immunology Ed.by WEIR,D.M.
Vol.2 (Cellular Immunology)
3rd ed. Blackwell scientific publications,Oxford p.23.2 and 7.(1978)

34) FOWLES,R.F.,FARJARDO,I.M.,LEIBOWITCH,J.L.,DAVID,J.D.
The enhancement of macrophage bacteriostasis by products of
activated lymphocytes
J.Exp.Med. 138:954 (1973)

35) FORSGREN,A.,SCHMELING,D.,QUIE,P.G.
Effect of tetracycline on the phagocytic function of human
leucocytes
J.Infect.Dis. 130:412 (1974)

36) FORSGREN,A.,BANCK,G.
Influence of antibiotics on lmyphocyte function in vitro
Infection 6(Suppl.1) 91 (1978)

37) FORSGREN,A.,SCHMELING,D.,BANCK,G.
Effect of antibiotics on chemotaxis of human polymorphnuclear leucocytes in vitro
Infection 6 (Suppl.1) 102 (1978)

38) FRUGONI,C.,GIUNCHI,G.
Antibiotika und Immunität bei bakteriellen Infektionen
Sci.Med. 3:205 (1954)

39) FURTH VAN,R.,COHN,Z.A.,HIRSCH,J.G.,HUMPHREY,J.H.,SPECTOR,W.G., LANGEFOORT,H.L.
The mononuclear phagocyte system.A new classification of macrophages,monocytes and their precursor cells
Bull.WHO 46:845 (1972)

40) FURTH VAN,R.,ZWET VAN,T.L.,LEIJH,P.C.J.
In vitro determination of phagocytosis and intercellular killing by polymorphnuclear and mononuclear phagocytes.
in:Handbook of experimental Immunology.Ed.by WEIR,D.M.
Vol.2 (Cellular Immunology) Oxford p. 32.1, (1978)

41) ZWET VAN,T.L.,CROFTON,R.,BLUSSE VAN OUD ALBLAS,A.
Characteristics,origin and kinetics of human and murine mononuclear phagocytes.In:Mononuclear phagocytes.Functional aspects.FURTH VAN,R. (Ed.) Martinus Nijhoff Publishers.
The Hague-Boston-London.p 279 (1980)

42) FURTH VAN,R.,
Current view on the mononuclear phagocyte system
Immunobiol., 161:178 (1982)

43) GANGULY,R.,WALDMANN,R.H.
Respiratory tract cell-mediated immunity
Bull.Eur.Physiopathol.Respir. 13:95 (1977)

44) GERSHON,R.K.,KONDO,K.
Cell interactions in the induction of tolerance:The role of thymic lymphocytes
Immunology 18:723 (1970)

45) GILLISSEN,G.
Antibiotika und Immunantwort-Begleiteffekte der Chemotherapie
Immunität und Infektion 8:79 (1980)

46) GILLISSEN,G.
Non-specific influence of antibiotics on the course of infectious processes
Infection 3 (1982)

47) GOLDESKI,J.,BRAIN,J.
The origin of alveolarmacrophages in mouse radiation chimeras
J.Exp.Med. 136:630 (1972)

48) GOLDSTEIN,E.,BARTLEMA,H.C.
Role of the alveolar macrophage in pulmonary bacterial defense
Bull.Eur.Physiopathol.Respir. 13:57 (1977)

49) GOUD,TH.J.L.M.,SCHOTTE,C.,FURTH VAN,R.
Identification and characterisation of the monoblast in mononuclear phagocyt colonies grown in vitro
J.Exp.Med. 142:1200 (1975)

50) HAHN,H.,KAUFMANN,S.H.E.
The role of cell mediated immunity in bacterial infections
Rev.Inf.Dis. 3:1221 (1981)

51) HAHN,H.,KAUFMANN,S.H.E.
T-lymphocytes-macrophage interaction in cellular antibacterial immunity
Immunbio. 161:361 (1982)

52) HERBERT,D.,PHIPPS,P.J.,STRANGE,R.E.
Chemical analysis of microbial cells.V.Carbohydrate analysis, in:Methods in Microbiology.Ed.by NORRIS,J.R.,RIBBONS,D.W.
Vol.5b,Academic Press,London-New York,p.265 (1971)

53) HERBERT,W.J.
Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animals.In:Handbook of experimental Immunology ed.by WEIR,D.M.;Vol.3 (Application of immunological methods) p A3.12 (1978)

54) HOCKING,W.G.,GOLDE,D.W.
The pulmonary-alveolar macrophage (first of two parts) New Engl.J.Med. 301:580 (1979)

55) HOLT,P.G.
Alveolar macrophagesI.A.simple technique for the preparation of viable alveolar macrophages from small laboratory animals J.Immunol.Methods 27:189 (1979)

56) HOWARD,J.G.,CHRISTIE,G.H.,COURTENAY,B.M.,LEUCHARS,E.,DAVIES,A.J.S.
Studies on immunological paralysis.II.Thymic independence of tolerance and immunity to type III pneumococcal polysaccharide. Cell.Immunol. 2:614 (1971)

57) HUNT,S.V.
Separation of lymphocyte sub-populations,in:Handbook of experimental Immunology ed.by WEIR,D.M. Vol.2 (cellular immunology) 3rd ed.Blackwell Sci.Publ.Oxford (1978)

58) JOHNSON,G.J.,RUSSEL,P.S.
Reaction of human lymphocytes in culture to components of the medium
Nature 208:343 (1965)

59) JONDAL,M.,HOLM,G.,WIGZELL,H.
Surface markers on human T- and B-lymphocytes.I.A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells
J.Exp.Med. 236:207 (1972)

60) KAPLAN,M.E.,CLARK,C.
An improved rosetting assay for detection of human T-lymphocytes
J.Immunol.Methods 5:131 (1974)

61) KELLY,B.S.,LEVY,J.G.,SIKORA,L.
The use of the enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection and quantification of specific antibody from cell cultures
Immunology 37:45 (1979)

62) KISSMEYER-NIELSEN,F.,THORSBY,E.
Human transplantation antigen.Appendix B.Lymphocytotoxity tests
Transpl.Rev. 4:121 (1970)

63) LIPSKI,P.E.,ROSENTHAL,A.
Macrophage-lymphocyte interaction I.Characteristics of the antigen-independent-binding of guinea pig thymocytes and lymphocytes to syngenic macrophages
J.Exp.Med. 138:900 (1973)

64) MACKANESS,G.B.
The monocyte in cellular immunity
Semin.Hematol. 7:112 (1970)

65) MAJESKI,J.A.,MCCLELLAN,M.A.,ALEXANDER,J.W.
Effect of antibiotics on the in vitro neutrophil chemotactic response
The Am.Surgeon p 785 (1976)

66) MARTIN,R.R.,WARR,G.A.
Zur Frage der Lungenschäden durch Zigarettenrauchen
Tempo medical 4:18 (1979)

67) MAXWELL,K.W.,DIETZ,T.,MARCUS,S.
An in situ method for harvesting guinea pig alveolar macrophages
Am.Rev.Respir.Dis. 89:579 (1964)

68) METSCHNIKOFF,E.
Untersuchungen über die intrazelluläre Verdauung bei wirbellosen Tieren.Arbeiten aus dem zoologischen Institute der Univ.Wien und der Station in Triest.
Bd.V,Alfred Hölder (K.K.Hof-und Universitätsbuchhändler)
Wien S.141 (1884)

69) METSCHNIKOFF,E.
Immunity in infective diseases.F.G.B.,translator.Cambridge University Press,London,England (1905)

70) MORLEY,J.,WOLSTENCROFT,R.A.,DUMONDE,D.C.
Measurement of lymphokines in:Handbook of experimental Immunology,ed.by WEIR,D.M.;Vol.2 (Cellular Immunology) 3rd ed.,Blackwell Scientific Publications Chap.27 (1978)

71) MORELLO,J.A.,BAKER,E.E.
Interaction of Salmonella with phagocytes in vitro
J.Infect.Dis. 115:131 (1965)

72) MUNSTER,A.M.,LOADHOLDT,C.B.,LEARY,A.G.,BARNES,M.A.
The effect of antibiotics on cell-mediated immunity
Surgery 81:692 (1977)

73) MYRVIK,Q.N.,LEAKE,E.S.,FARRIS,B.
Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit:a technique to produce them in a high state of purity
J.Immunol. 86:128 (1961)

74) NATHAN,C.F.,KARNOVSKI,M.L.,DAVIO,J.R.
Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes
J.Exp.Med. 133:1356 (1971)

75) OPITZ,H.G.,LEMKE,H.,HEWLETT,G.
Activation of T-cells by macrophages or 2-mercaptoethanol; Activatet serum factor is essential for induction of primary immune response to heterologous red cells in vitro
Immunol.Rev. 40:53 (1978)

76) OUCHI,E.,SELVARAJ,R.J.,SBARRA,A.J.
The biochemical activities of rabbit alveolar macrophages during phagocytosis
Exp.Cell Res. 40:456 (1965)

77) PARANT,M.,GALELLI,A.,PARANT,F.,CHEDID,L.
Role of B-lymphocytes in nonspecific resistance to
Klebsiella pneumoniae infection of endotoxin-treated
mice
J.Infect.Dis.Vol.134 No 6:531 (1976)

78) PAUL,J.
Cell and tissue culture
4th ed. (reprint)
Churchill Livingstone,Edinburgh-London p 135 (1972)

79) PIERCE,C.W.,KAPP,J.A.,WOOD,D.D.,BENACERRAFF,B.
Immune responses in vitro X.Functions of macrophages
J.Immunol. 112:1181 (1974)

80) RABINOVITCH,N.
Phagocytic recognition.In:Mononuclear Phagocytes,ed. FURTH VAN,R.
Oxford Blackwell Scientific Publications;p 299 (1970)

81) RIISGAARD,S.,RHODES,J.M.,BENNEDSEN,J.
Macrophage activation by lymphokines and after direct contact with
sensitized lymphocytes:Histocompatibility requirements and
effect of inhibitors
Scand.J.Immunol. 7:209 (1978)

82) ROCKLIN,R.E.
Lymphokines:Mediators of delayed hypersensitivity;
Progress in clinical and biol,Research 58:7 (1981)

83) ROOS,B.
Makrophagen:Herkunft,Entwicklung und Funktion.in:Handbuch
der allgemeinen Pathologie.Hrg.v.ALTMANN,H.W.,BÜCHNER,F.
COTTIER,H.,GRUNDMANN,E.,HOLLE,G.,LETTERER,E.,MASSHOF,W.,
MEESSEN,H.,ROULET,F.,SEIFERT,G.,SIEBERT,G.,STUDER,A.
Bd VII/3 (Immunreaktion),Springer,Berlin,Heidelberg,New York
S.1 (1970)

84) SHORTMAN,K.,WILLIAMS,N.,ADAMS,P.
The separation of different cell classes from lymphoid organs. V.Simple procedures for the removal of cell debris,damaged cells and erythroid cells from lymphoid cell suspensions
J.Immunol.Method. 1:273 (1972)

85) SIMON,H.B.,SHEAGREN,J.N.
Enhancement of macrophage bactericidal capacity by antigenically stimulated immune lymphocytes
Cell.Immunol.4:163 (1972)

86) SIPKA,S.,SZERZE,P.,SZABÓ,M.,BALÁZS,C.,SZILÁGYI,T.
Stimulation of phagocytosis by human lymphokines
Acta microb.Acad.Sci.hung. 25:199 (1978)

87) STENSON,W.F.,PARKER,C.W.
Prostaglandins,macrophages and immunity
J.Immunol. 125:1 (1980)

88) STUART,A.E.,HABERSHAW,J.A.
Cultures of pulmonary macrophages,in:Handbook of experimental Immunology Ed. by WEIR,D.M. Vol.2 (cellular Immunology) 3rd ed.Blackwell scientific publications,Oxford p. 31. 18 (1978)

89) SUTHERLAND,I.W.,WILKINSON,J.F.
Chemical extraction methods of microbial cells in:Methods in Microbiology Ed.by NORRIS,J.R.,RIBBONS,D.W.Vol.5 B (Polysaccharids)
Academic Press,London-New York p.363 (1971)

90) TEWARI,R.P.,KUGEL,H.L.
Suppressive effect of streptomycin on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages for histoplasma capsulatum.
Mycopathologica 44:231 (1971)

91) THOMAS,D.,NIEDERHUBER,J.E.,Universität Michigan,USA
Persönliche Mitteilung (1982)

92) UNDEUTSCH,C.,BRUNNER,H.
Einfluß von Antikörpern auf die Phagozytose von Klebsiella pneumoniae durch Alveolarmakrophagen
Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.A249 (1981)

93) UNDEUTSCH,C.,BRUNNER,H.
Einfluß von Antibiotika auf die Phagozytose von Klebsiella pneumoniae durch Alveolarmakrophagen
Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig. A 249 :53 (1981)

94) UNANUE,E.R.
The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation
Adv.Immunol. 15:95 (1972)

95) UNANUE,E.R.
The regulation of lymphocyt functions by the macrophage
Immunol.Rev. 40:227 (1978)

96) URBANIAK,S.J.,WHITE,A.G.,BARCLAY,G.R.,WOOD,S.M.,KAY,A.B.
Tests of immune function,in:Handbook of experimental Immunology ed.by WEIR,D.M.Vol.3 (Application of immunological methods) 3rd ed. Blackwell Sci.Publ.Oxford p.47. 3and12 (1978)

97) VOISIN,C.,MACQUET,V.,AERTS,C.,GERNEZ-RIEUX,C.
Prélévement des macrophages alvéolaires par voie bronchique
Les Bronches 14:49 (1964)

98) VOLLER,A.,BIDWELL,D.,BARTLETT,A.
Microplate enzyme immunoassay for the immundiagnosis of virus infections.In:Manual of clinical Immunology,Washington D.C. p.506 (1976)

99) WAGNER,J.E.,MANNING,P.J.
The biology of the guinea pig
Academic Press,New York-San Francisco-London p.127 (1976)

100) WAHL,S.M.,ROSENSTREICH,D.L.
Role of B-lymphocytes in cell-mediated immunity,I.Requirement for T-cells or T-cellproducts for antigen-induced B-cell activation
J.Exp.Med. 144:1175 (1976)

101) WALTER,A.M.,HEILMEYER,L.,OTTEN,H.,PLEMPEL,M.,SIEGENTHALER,W.
Antibiotika-Fibel
4.Aufl.,Thieme,Stuttgart S.362 (1975)

102) WEIDEN,P.,STORB,R.,TSOI,M.S.
Marrow origin of canine alveolar macrophages
J.Retculoendothel.Soc.17:342 (1975)

103) WESTPHAL,O.,LÜDERITZ,O.,BISTER,F.
Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser
Z.Naturforsch. 7b:148 (1952)

104) WILHELM,J.M.,JESSOP,J.J.,PETTITT,S.E.
Aminoglycoside antibiotics and eukaryotic protein synthesis:
Stimulation of errors in the translation of natural messengers
in extracts of cultured human cells
Biochemistry 17:1149-1153 (1978)

105) WILSON,A.B.,HAEGERT,D.G.,COOMBS,R.R.A.
Increased sensivity of the rosette-forming reaction of human
T-lymphocytes with sheep erythrocytes afforded by Papain
treatment of the sheep cell
Clin.exp.Immunol. 22:177 (1975)

106) WINTROBE,M.M.
Clinical Hematology,6th Ed.,Philadelphia:Lea u.Febiger (1967)

107) WRIGHT,A.E.,DOUGLAS,S.R.
Role of the blood fluids in phagocytosis
Proc.Roy.Soc.B. 72:357 (1903)

108) WUNDT,W.
Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie 4.Aufl.Herausgeg.von:
OTTE,H.J.,BRANDIS,H.;G.Fischer Verl. Stuttgart-New York
S.251 (1978)

109) YOSHINAGA,M.,YOSHINAGA,A.,WAKSMAN
Regulation of lymphocyte responses in vitro I.Regulatory effect
of macrophages and thymus-dependent (T) cells on the response
of thymus-independent (B) lymphocytes to endotoxin
J.Exp.Med. 136:956 (1972)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.H.Brunner für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit,seine wertvollen Anregungen und die mir jederzeit gewährte Unterstützung.
Herrn J.Wirtz danke ich für seine Hilfe bei den Tierversuchen.

Lebenslauf

Am 12.Juni 1957 wurde ich, Horst Schroten, als Sohn des Otto Schroten und seiner Ehefrau Dorothea, geb.Auweiler, in Langenfeld geboren. Dort besuchte ich von 1964-1967 die Grundschule und von 1967-1976 das Konrad-Adenauer-Gymnasium. Nach dem Abitur begann ich im Oktober 1976 das Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf. Nach bestandenem Staatsexamen erhielt ich am 12.11.1982 die Approbation als Arzt. Ich bin verheiratet. Wir haben ein Kind. Seit 3.1.1983 leiste ich meinen Grundwehrdienst als Truppenarzt ab.

Druck und Verarbeitung: Dissertations Druck Darmstadt, Tel. 0 61 51 / 213 53